TESIS DEFENDIDA POR

Laura Camacho Jiménez

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director del Comité

Dra. María Enriqueta Muñoz Márquez
Miembro del Comité

Dra. Blanca Claudia Farfán
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del programa de posgrado en ciencias de la vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

28 de Noviembre de 2011.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS

EN CIENCIAS DE LA VIDA

PAPEL DE LA DOPAMINA Y DE LA NEUROHORMONA RECOMBINANTE CHH-B1 EN LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS EN EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

LAURA CAMACHO JIMÉNEZ

Ensenada, Baja California, México, Noviembre del 2011.

RESUMEN de la tesis de **Laura Camacho Jiménez,** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Noviembre de 2011.

PAPEL DE LA DOPAMINA Y DE LA NEUROHORMONA RECOMBINANTE CHH-B1 EN LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS EN EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

Resumen aprobado por:

_____

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

La hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) es una de las neurohormonas más importantes sintetizadas en el órgano X-glándula del seno. De las diferentes CHH's producidas en *Litopenaeus vanammei*, CHH-B1 ha mostrado actividad hiperglucémica, sin embargo no se descarta su participación en otras funciones como muda y osmoregulación. Por otra parte, se ha encontrado que aminas biogénicas como la dopamina regulan algunas respuestas fisiológicas de *L. vannamei* bajo condiciones de estrés. En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio del papel de CHH-B1 recombinante con un extremo C-terminal adicional (CHH-$B1_{His}$) y del impacto de la dopamina en la modulación de respuestas fisiológicas en la hemolinfa del camarón blanco *L. vannamei* bajo condiciones hiper-osmóticas.

CHH-$B1_{His}$ fue expresada en *P. pastoris* y analizada mediante PAGE-SDS. Las condiciones óptimas para su expresión fueron 3 días de cultivo y 2% de metanol. La neurohormona fue escalada y purificada mediante cromatografía de afinidad obteniéndose un rendimiento de 5.72 mg/L. Se realizaron bioensayos con sub-adultos de *L. vannamei* aclimatados a 26 °C y 35 ‰, inyectando 2 µg de CHH-$B1_{His}$ o $2x10^{-6}$ moles/camarón de dopamina en periodo de intermuda. La hemolinfa de camarones fue muestreada de manera individualizada a las 0.5, 1, 2, 4 y 24 h post-inyección para llevar a cabo la determinación de diferentes respuestas fisiológicas.

CHH-$B1_{His}$ provocó un aumento significativo en la concentración de glucosa y triglicéridos de la hemolinfa, presentando valores máximos a 1 h y 2 h post-inyección respectivamente. Así mismo, se observó una disminución significativa en los niveles de proteínas entre las 4 y 24 h post-tratamiento, mientras que la inyección de dopamina aumentó de manera significativa los niveles de glucosa en los camarones con un máximo registrado a 1 h post-inyección y disminuyó

progresivamente los niveles de triglicéridos. Sin embargo, el neurotransmisor no tuvo efecto sobre los niveles de proteínas totales en la hemolinfa de los camarones. Ninguna de las dos sustancias aplicadas tuvo un efecto en la concentración de oxihemocianina, por lo que no se observaron cambios significativos en la relación oxihemocianina/proteínas totales en comparación con el control. El aumento en los niveles de glucosa por la inyección de CHH-$B1_{His}$ y dopamina sugiere que la hiperglucemia observada con dopamina estuvo mediada a través de CHH-$B1_{His}$.

Asimismo, CHH-$B1_{His}$ y dopamina ocasionaron un incremento en la presión osmótica de los organismos. Sin embargo, CHH-$B1_{His}$ provocó un aumento en la capacidad osmorreguladora contrario a la disminución observada en el tratamiento con dopamina. Estos resultados en conjunto sugieren que tanto la neurohormona CHH-$B1_{His}$ como la dopamina tuvieron un efecto metabólico en *L. vannamei* bajo condiciones hiper-osmóticas. Así mismo se sugiere que la neurohormona mejoró la capacidad de hipo-osmorregular de los organismos, y que la dopamina tuvo una posible función como neuromodulador en la activación de los mecanismos de osmorregulación.

Palabras Clave: *Litopenaeus vannamei*, CHH-B1, proteína recombinante, *Pichia pastoris*, dopamina, respuestas fisiológicas, metabolismo, osmorregulación.

ABSTRACT of the thesis presented by **Laura Camacho Jimenez** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Sciences with Orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México November 2011.

ROLE OF THE DOPAMINE AND THE RECOMBINANT CHH-B1 NEUROHORMONE IN THE MODULATION OF PHYSIOLOGICAL RESPONSES IN THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is one of the most important neurohormone synthesized in the X-organ sinus gland. From the differents CHH's produced in *Litopenaeus vannamei*, CHH-B1 had shown hyperglycemic activity; however their participation in other functions such as molt and osmoregulation has been not discarded. On the other hand, it has been found that biogenic amines like dopamine regulates some physiological responses of *L. vannamei* under stressfull conditions. In this work was carried out the study of the role of recombinant CHH-B1 with an additional C-terminus end (CHH-$B1_{His}$) and the impact of dopamine in the modulation of physiological responses in the hemolymph of the white shrimp *L. vannamei* under hyper-osmotic conditions.

CHH-$B1_{His}$ was expressed in *P. pastoris* and analyzed by SDS-PAGE. The optimal conditions for expression were 3 days of culture and 2% methanol. The neurohormone was scaled up and purified by affinity chromatography obtaining a yield of 5.72 mg/L. Bioassays were conducted with sub-adult *L. vannamei* acclimated to 26 °C and 35 ‰, injecting 2 µg of CHH-$B1_{His}$ or $2x10^{-6}$ mol/shrimp of dopamine on intermolt period. The shrimp hemolymph was collected on an individual way at 0.5, 1, 2, 4 and 24 h post-injection to carry out the determination of different physiological responses.

CHH-$B1_{His}$ caused a significant increase in glucose and triglycerides concentration, obtaining the highest values at 1 h and 2 h post-injection respectively and a significant decrease in protein was observed between 4 and 24 h post-treatment, whereas dopamine significantly increased the levels of glucose of the shrimps with a maximum at 1 h post-injection and gradually decreased the triglyceride levels. However, the neurotransmitter had no effect on total protein levels in the hemolymph of the shrimp. Neither of the two substances applied had an effect on the oxyhemocyanin content, so there were not significant changes observed in the oxyhemocyanin/total protein ratio compared with control. The increase in glucose levels by CHH-$B1_{His}$ injection and dopamine suggests that the hyperglycemic activity observed with dopamine is mediated through CHH-$B1_{His.}$

Also, CHH-$B1_{His}$ and dopamine caused an increase in osmotic pressure of the organisms. However, CHH-$B1_{His}$ produced an increase in osmoregulatory capacity contrary to the observed decrease in dopamine treatment. These results suggest

that both CHH-B1$_{His}$ neurohormone and dopamine had a metabolic effect in *L. vannamei* under hyper-osmotic conditions. They also suggest that the neurohormone improved the hypo-osmoregulatory capacity of organisms, and that dopamine had a possible function as neuromodulator on the activation of the osmoregulation mechanisms.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, CHH-B1, recombinant protein, *Pichia pastoris*, dopamine, physiological responses, metabolism, osmoregulation.

Dedicatorias

A Dios y a mis padres por su amor incondicional
y estar siempre conmigo

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), por otorgarme la beca No. 230285 para la realización de mis estudios de maestría.

De nuevo a CONACyT por el apoyo para la realización de la parte experimental a través del proyecto de ciencia básica a cargo de la Dra. Elizabeth Ponce Rivas.

Al CICESE por recibirme como estudiante de posgrado y permitirme el uso de sus instalaciones durante mi estancia.

Al personal académico que conforma el posgrado en Ciencias de la Vida, en especial al cuerpo académico del departamento de Biotecnología Marina por la formación que recibí en estos dos años de estudios.

A mi directora la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo de tesis, por todo el apoyo brindado durante ese proceso, sus valiosas enseñanzas y consejos, y también por tenerme paciencia.

A los miembros de mi comité, la Dra. Enriqueta Muñoz, la Dra. Claudia Farfán y el Dr. Fernando Díaz por sus asesorías, comentarios y sugerencias, antes y durante la realización de esta tesis, y por su ayuda con los bioensayos.

A los técnicos Ernesto Lerma y Manuel Parra por su ayuda para la puesta en marcha de los sistemas usados para el cultivo de los camarones.

A la Dra. Edna Sánchez por compartir conmigo su experiencia acerca de la expresión de proteínas recombinantes y de otras técnicas de laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Celular y Molecular del departamento de Biotecnología Marina, Oscar González, Jeannette Martínez y Roberto Arredondo por su apoyo moral y con las labores del laboratorio.

A la técnico M. en C. Carmen Vargas del departamento de Acuicultura y a las chicas de servicio social por su apoyo con los bioensayos.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y a Marisol del laboratorio de Reproducción y Desarrollo del departamento de Acuicultura por el préstamo de su lector de microplacas.

A mis padres Juan Carlos y Ma. Teresa por apoyarme siempre a lo largo de estos 26 años, por impulsarme a conseguir mis metas, ser el mejor ejemplo de vida que puedo tener, y sobre todo por confiar en mí. Los amo muchísimo.

A mi hermano Juan Carlos, porque aunque las demostraciones de cariño no son nuestro fuerte, siempre estas para mí en las buenas y en las malas.

A mi familia en La Paz: mi abuela Queta y a mis tíos Clara, Elvira, Cruz, Rodolfo, Angelita y Margarita, así como a mis primos porque siempre están al pendiente de mi.

A toda la gente “curada” que conocí aquí Ensenada (o que ya conocía pero aquí me vine a encontrar de nuevo) y a mis compañeros del posgrado por compartir conmigo sus conocimientos en las clases y en el laboratorio. En especial a Mariela, Melissa, Ana, Sergio, Liliana, Abraham, Emiliano, Abraham, Félix, Jairo, Gilberto, Roberto, gracias por su amistad, compañerismo, fiestas, risas y demás cosas vividas en este tiempo.

De nuevo a Mariela (Brito), Mel, Ana, Lily y Abraham por brindarme su amistad sincera, su apoyo, aconsejarme y darme ánimos Estoy muy agradecida por haber conocido gente con gran calidad humana y que estoy segura recordaré con cariño el resto de mi vida. Los quiero, son “la onda” morros!.

A mis “compas” de La Paz y de la UABCS, Ilhui, Cass, Polo, Lulú, Jony, Charly y Juan porque siempre me han estado echando porras a distancia, por hacer amenas mis escasas vacaciones y estar ahí para escucharme llorar o reír aunque sea por Messenger, Facebook o teléfono (jaja).

Y sobre todo agradezco a Dios por permitirme concluir una etapa más de mi vida.

"Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber."

Albert Einstein (1879-1955)

CONTENIDO

	Página
Resumen español……..……..…….	**i**
Resumen ingles……..……	**iii**
Dedicatorias……..……	**v**
Agradecimientos……..……...	**vi**
Contenido……..……	**viii**
Lista de Figuras…….…..……	**xii**
I. Introducción……..…..……..	**1**
II. Antecedentes……..	**4**
II.1 El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*…….	4
II.2 Sistema neuroendocrino en crustáceos……..	7
II.3 Neurohormonas del complejo OX-GS……..	9
II.4 Hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH)…….	10
II.5 Isoformas de CHH……...	13
II.6 La dopamina como neuromodulador en crustáceos…….	14
II.7 CHH's de *Litopenaeus vannamei*…….	16
II.8 Dopamina como modulador fisiológico en *Litopenaeus vannamei*……..……...	18
III. Justificación…..	**20**
IV. Hipótesis…..	**21**
V. Objetivos…..	**22**
V.1 Objetivo general……..	22
V.2 Objetivos específicos……..	22
VI. Materiales y Métodos……..	**23**
VI.1 Integración de la construcción pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de *Pichia pastoris*…….	23
VI.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico…….……..	23
VI.1.2 Linearización del plásmido pPICZαA/CHH-B1…….…….	24

CONTENIDO (continuación)

Página

VI.1.3 Transfección a *P. pastoris*…….. 25

VI.2 Expresión y purificación de las neurohormonas CHH-B1 nativa y CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional…….. 26

VI.2.1 Expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa en la levadura *Pichia pastoris*……. 27

VI.2.1.1 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa.. 27

VI.2.1.2 Precipitación de proteínas……. 28

VI.2.1.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (Tricina-SDS-PAGE)……... 29

VI.2.2 Expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$ en la levadura *Pichia pastoris*…….. 29

VI.2.2.1 PCR de colonia……..…….. 29

VI.2.2.2 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$……. 30

VI.2.2.3 Precipitación de las proteínas……... 30

VI.2.2.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (Tricina-SDS-PAGE)……... 30

VI.2.2.5 Inmunodetección por Western Blot…….. 30

VI.2.2.6 Escalamiento del cultivo……. 31

VI.2.2.7 Purificación por cromatografía de afinidad…….. 31

VI.2.2.8 Concentración de la proteína recombinante……... 31

VI.2.2.9 Cuantificación por el método del ácido bicinconínico (BCA)…… 32

VI.3 Efecto de la dopamina y de la neurohormona CHH-B1 en los niveles de respuestas fisiológicas en la hemolinfa de camarones juveniles *L. vannamei*…… 33

VI.3.1 Crecimiento y mantenimiento de organismos…… 33

VI.3.2 Bioensayos…….. 33

VI.3.2.1 Condiciones experimentales……. 33

CONTENIDO (continuación)

Página

VI.3.2.2 Control experimental general…… 34

VI.3.2.3 Inyección con solución salina…… 34

VI.3.2.4 Inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$…… 35

VI.3.2.5 Inyección con dopamina……. 35

VI.3.2.6 Obtención de muestras de hemolinfa…….. 35

VI.3.3 Determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa……. 35

VI.3.3.1 Presión osmótica y capacidad osmorreguladora……... 35

VI.3.3.2 Oxihemocianina.……..…… 36

VI.3.3.3 Análisis de metabolitos plasmáticos……. 36

VI.3.3.3.1 Obtención de plasma sanguíneo……... 36

VI.3.3.3.2 Proteínas totales……..…… 36

VI.3.3.3.3 Relación oxihemocianina/proteínas totales…… 37

VI.3.3.3.4 Glucosa…….. 37

VI.3.3.3.5 Triglicéridos……... 38

VI.3.3.4 Análisis estadísticos…… 38

VII. Resultados y Discusión…….. 40

VII.1 Integración de la construcción pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de *Pichia pastoris*……...…….. 40

VII.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico……..… 40

VII.1.2 Transfección a *P. pastoris*…… 43

VII.2 Expresión y purificación de las neurohormonas CHH-B1 nativa y CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional…….. 45

VII.1 Expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa en la levadura *Pichia pastoris*……. 45

VII.2.1.1 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa. 45

CONTENIDO (continuación)

Página

VII.2.2 Expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$ en la levadura *Pichia pastoris*…….. 47

VII.2.2.2 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$…… 47

VII.2.2.3 Escalamiento del cultivo…… 48

VII.2.2.4 Purificación por cromatografía de afinidad……. 51

VII.3. Bioensayos…… 52

VII.3.1 Determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa……. 54

VII.3.1.1 Glucosa……... 54

VII.3.1.2 Triglicéridos……. 61

VII.3.1.3 Oxihemocianina, proteínas totales y relación oxihemocianina/proteínas totales…… 66

VII. 3.1.4 Presión osmótica y capacidad osmorreguladora……. 78

VIII. Conclusiones…… 86

IX. Perspectivas…… 88

X. Literatura citada……. 89

XI. Anexos…….. 104

LISTA DE FIGURAS

Figura		**Página**
1	Distribución geográfica de *Litopenaeus vannamei*…….	5
2	Esquema general del ciclo de vida de un peneido……	5
3	Principales centros neuroendocrinos en crustáceos……..	8
4	Localización del complejo órgano X-glándula del seno en el pedúnculo ocular de crustáceos decápodos…….	9
5	Regulación de la secreción de la CHH……..	12
6	Estructura del gen *chhB* y sus dos transcritos producidos por corte y empalme alternativo, chh-B1 y chh-B2……..	17
7	Extracciones de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* transformadas con el plásmido pPicZαA/CHH-B1……	40
8	Productos de PCR a partir del plásmido pPicZαA/CHH-B1	41
9	Amplificación del plásmido pPICZαA/CHH-B1…….	42
10	Producto de PCR purificado correspondiente al plásmido pPICZαA/CHH-B1……	42
11	Amplificación por PCR a partir de de colonias de *Pichia* transformadas con el plásmido pPicZαA/CHH-B1 utilizando los oligonucleótidos α-factor y 3'AOX1……..	43
12	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida para CHH-B1……..	44
13	Análisis de los sobrenadantes de los cultivos de inducción de *P. pastoris* con 0, 1, 2 y 4% de metanol para la expresión de CHH-B1 mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 16.5% teñidos con azul de Coomassie……	46
14	Amplificación de un fragmento de la construcción pPICZαA/CHH-B1$_{His}$, a partir de colonias de la cepa KM71/CHH-B1$_{His}$……	48

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
15	Análisis de los sobrenadantes de los cultivos de inducción de *P. pastoris* con 0, 1, 2 y 4% de metanol para la expresión de CHH-B1$_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 16.5% teñidos con azul de Coomassie……	49
16	Inmunodetección por western blot de CHH-B1$_{His.}$ Con anti-*c-myc*-HRP (Invitrogen) en los cultivos de inducción de *P. pastoris* a 2 y 4% de metanol……..	50
17	Análisis de las cosecha de los cultivos de *P. pastoris* del escalamiento para la producción de neurohormona CHH-B1$_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 16.5% teñido con azul de Coomassie…	51
18	Análisis de la purificación de CHH-B1$_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 16.5% teñido con azul de Coomassie……...	52
19	Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina……...	53
20	Regresión lineal para los valores de absorbancia y las concentraciones conocidas de BSA……..	55
21	Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$.....	57
22	Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina.	59

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
23	Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina……..	62
24	Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$.....	63
25	Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina	65
26	Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina……	67
27	Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina……	68
28	Análisis de regresión lineal para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina……	69
29	Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$.....	71
30	Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$.....	72

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
31	Análisis de regresión lineal para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$	73
32	Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina	75
33	Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina	76
34	Análisis de regresión lineal para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina	77
35	Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina	79
36	Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con solución salina	80
37	Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$	81
38	Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$	82

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
39	Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina……..	84
40	Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes y después de la inyección con dopamina..	85

I. Introducción

El cultivo y comercio de especies acuícolas son actividades que actualmente muestran una gran tendencia al crecimiento y expansión en respuesta a la amplia demanda de sus productos en el mercado mundial. De manera particular, la camaronicultura ha resultado un ejemplo de éxito comercial, incrementando su producción desde el año de 1997 al año de 2007 en un 21% siendo *Litopenaeus vannamei* la especie dominante en este sector al representar el 75% de la producción total de camarón según estadísticas de la FAO en el 2007. Esto es debido a que es una especie resistente a enfermedades, presenta una mayor tasa de crecimiento en cultivo (hasta más de 3/semana), puede cultivarse a altas densidades (hasta 400 m^2 en sistemas de recirculación), una amplia tolerancia a diferentes condiciones de salinidad (0.5-45 ‰) y a la temperatura (≈ 15-30 °C), una buena resistencia a enfermedades y una alta supervivencia de larvas (50-60%) (Briggs *et al*., 2004; Davis *et al*., 2007).

Los estudios fisiológicos y endocrinológicos sobre los mecanismos que controlan el crecimiento, maduración y reproducción de camarones peneidos se han vuelto cada vez más importantes para el desarrollo de la camaronicultura, ya que los organismos frecuentemente se encuentran sometidos a estrés. La aplicación de técnicas de endocrinología clásica y el uso de las técnicas modernas ofrecidas por la bioquímica y biología molecular ha permitido la identificación de tejidos endocrinos, genes, y la caracterización de secuencias genéticas y de aminoácidos que permiten dilucidar su estructura y posible función *a priori*. Sin embargo, existen muy pocos estudios enfocados al estudio de la regulación hormonal de la fisiología de crustáceos (De Kleijn y Van Herp, 1995; Fingerman, 1997; Huberman, 2000).

Los procesos fisiológicos en crustáceos se encuentran principalmente regulados por neurohormonas de naturaleza peptídica que les permiten responder a cambios externos ajustando sus funciones vitales a las necesidades de cada

momento. El principal centro neuroendocrino en decápodos es el del complejo del órgano X-glándula del seno (OX-GS) localizado en los pedúnculos oculares. En este sitio se sintetizan y almacenan una gran variedad de neuropeptidos que colectivamente se conocen como la familia peptídica CHH/MIH/GIH. Estas neurohormonas regulan varios procesos fisiológicos como el crecimiento, la maduración y la reproducción, y su secreción responde a cambios en factores ambientales como la temperatura y salinidad (Reddy y Ramamurthi, 1999; Serrano *et al*., 2004).

Por otra parte, la neurohormona sintetizada en mayor abundancia relativa por OX-GS es la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH). Su principal función es estimular la glucogenólisis en el hepatopáncreas y la subsecuente elevación de la glucosa en la hemolinfa haciéndola biodisponible para su utilización en los tejidos, sin embargo, existe evidencia directa e indirecta de que está involucrada en otros procesos como el metabolismo de lípidos, osmorregulación, la muda y el crecimiento. Esta pleiotropía funcional es atribuida a la existencia de isoformas como se ha observado en varias especies de crustáceos (Santos *et al*.; 1997; Serrano *et al*., 2003; Chung y Webster, 2006; Fanjul, 2006).

La hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-B1 de *L. vannamei* ha sido clonada y expresada previamente por Sánchez-Castrejón *et al*. (2008).Aunque esta neurohormona presenta una región C-terminal adicional, mostró actividad hiperglucémica en ensayos biológicos *in vivo* y no se descarta que esté relacionada con otros procesos importantes como el metabolismo de lípidos, el control de la muda, osmoregulación y reproducción. Por otro lado, los cambios en la síntesis y liberación de la neurohormona CHH parece estar sujeta a mecanismos nivel del sistema nervioso, dependientes de la secreción de sustancias neuromoduladoras y neurotransmisores, como la dopamina. Existen evidencias de que esta amina biogénica tiene un papel modulador sobre algunas respuestas fisiológicas y metabólicas de peneidos en ciertas condiciones de estrés (Fingerman *et al*., 1994; Sarojini *et al*., 1995). Sin embargo, los resultados con los

que se cuenta son poco claros. Los efectos de estos elementos neurorreguladores en crustáceos pueden ser evaluados mediante la medición de diferentes respuestas fisiológicas en la hemolinfa que varios autores señalan como indicadoras de cambios en el metabolismo, o en la capacidad de osmorregulación. En peneidos hay diversos estudios que proponen la cuantificación de analítos plasmáticos para conocer el uso que se les da a las biomoléculas como sustrato energético, y por otro lado la cuantificación de la presión osmótica que permita conocer la capacidad de osmorregular de los individuos bajo condiciones específicas (Lignot *et al*., 2000; Racotta y Hernández-Herrera., 2000; Pascual *et al*., 2003; Sánchez-Campos *et al*., 2010; Aparicio-Simón *et al*., 2010).

Tomando en cuenta el limitado conocimiento acerca de la actividad biológica de CHH-B1 y de los efectos de la dopamina en la fisiología de *L. vannamei* y la posible relación entre ambos elementos, se llevó a cabo el estudio de la función de CHH-B1 recombinante (con un extremo C-terminal adicional) y de la dopamina en la regulación metabólica y osmorregulación del camarón blanco *L. vannamei* bajo condiciones hiper-osmóticas.

II. Antecedentes

II.1 El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *L. vannamei* (Boone, 1931) pertenece a la familia Penaeidae, la cual se compone de un gran número de especies de importancia comercial, es una especie endémica del Océano Pacífico oriental, con un rango de distribución geográfica que abarca desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú (Fig. 1) (FAO, 2006). El alto potencial de cultivo de esta especie se debe a que presenta un crecimiento relativamente rápido (más de 3 g/semana), puede cultivarse en altas densidades (hasta 400/m^2 en sistemas de recirculación), tiene una amplia tolerancia a la salinidad (0.5-45 ‰) y a la temperatura (~15-30°C), alta resistencia a enfermedades y alta supervivencia de larvas (50-60%). Todos estos conocimientos han sido obtenidos mediante la ardua investigación a la cual se ha sometido *L. vannamei* en muchos países de América, Asia y Oceanía (Briggs *et al*., 2004; Davis *et al*., 2004).

El ciclo de vida de los camarones peneidos en el medio natural (Fig. 2), es en gran medida dependiente de los ambientes estuarinos o lagunares, a los cuales ingresa como postlarva de vida planctónica, donde permanecen hasta alcanzar la etapa juvenil. Posteriormente, los camarones crecen durante varios meses hasta alcanzar la fase sub-adulta, y es en esta etapa cuando salen de los estuarios o lagunas costeras hacia el mar abierto. En mar abierto se convierten en adultos, alcanzando la madurez sexual, reproducción y desove; los huevos eclosionan como larvas nauplios de vida planctónica. Las primeras fases larvarias transcurren en mar abierto, y tienen una duración de tres semanas a un mes antes de su entrada a los estuarios. De manera general el desarrollo larvario en camarones peneidos progresa a través de varios estadios sucesivos: varias fases “nauplio”, “protozoea”, y “misis”, todas de vida planctónica. El paso de una etapa a otra involucra eventos consecutivos de muda (García y Le Reste, 1986; Pérez-Castañeda y Defeo, 2005).

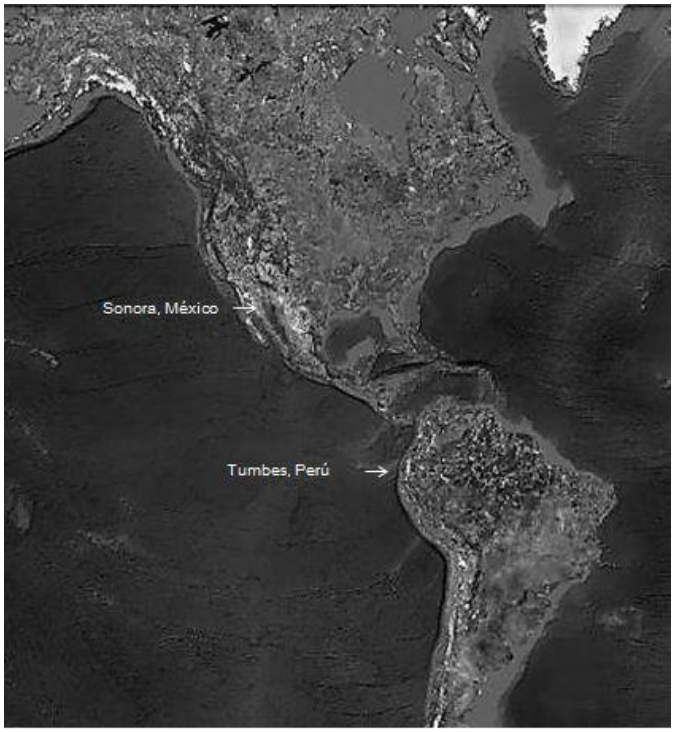

Figura 1. Distribución geográfica de *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2006).

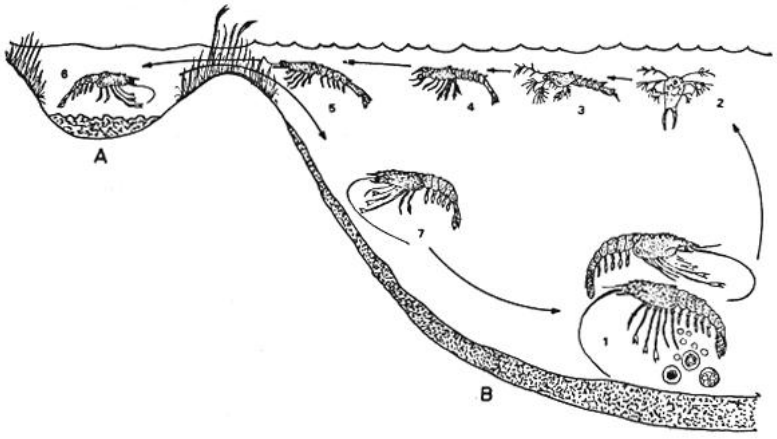

Figura 2. Esquema general del ciclo de vida de un peneido: 1: maduración y reproducción; 2: nauplio; 3: protozoea; 4: misis; 5: post-larva; 6; juvenil; adulto (Fenucci, 1988).

Debido a los cambios en las condiciones de hábitat que experimentan los peneidos a lo largo de su ciclo de vida, estos se ven altamente influenciados en su fisiología por fluctuaciones en los factores ambientales, en particular a las a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad (Díaz *et al*., 2001).

Como en todo organismo acuático, la temperatura y la salinidad, son factores que repercuten directamente sobre la distribución y su supervivencia, influenciando la migración, maduración, desove, desarrollo, crecimiento, habilidad de competencia inter e intra-específica, y la resistencia a parásitos, enfermedades y contaminación (Armour, 1991; Lutterschmidt y Hutchinson, 1997; Re *et al*., 2006).

El camarón blánco *L. vannamei*, es un organismo euritérmico. Experimentalmente, bajo condiciones de cultivo, se ha encontrado que la mayor supervivencia de juveniles ocurre entre los 20-30°C mientras que a temperaturas de 25-35°C se obtiene un mejor crecimiento (Ponce-Palafox *et al*., 1997). Sin embargo, la temperatura preferida determinada en adultos de *L. vannamei* es de 26 ± 0.88 °C (González *et al*., 2010).

Con respecto a la salinidad, *L. vannamei*, es una especie eurihalina ya que puede habitar aguas con baja salinidad (1-2 ‰) así como aguas hiper-salinas con 40 ‰ o inclusive más. El patrón de osmorregulación del camarón blanco varía de acuerdo a la salinidad del medio, con un patrón hiper-osmótico a bajas salinidades e hipo-osmótico a altas salinidades, presentando su punto iso-osmótico alrededor de una salinidad de 25-26 ‰ (Díaz *et al*., 2001; Valdez *et al*., 2008).

Los cambios en estos factores abióticos pueden originar una condición de estrés en los organismos. El estrés es una alteración cuantificable del estado fisiológico inducido por un cambio ambiental, y que hace al individuo más vulnerable a futuros cambios ambientales (Bayne, 1975). Los factores antes mencionados también afectan la demanda de energía en los organismos y por lo tanto existen modificaciones en el metabolismo energético para tratar de contrarrestar el estrés, por lo cual, al ser el camarón una especie cultivable es

necesario examinar respuestas que permitan monitorear lo efectos del estrés sobre la fisiología.

Se han propuesto distintas metodologías para la cuantificación de varias respuestas fisiológicas indicadoras del efecto de las condiciones ambientales y nutricionales de crustáceos en cultivo. La medición de ciertas variables metabólicas, como por ejemplo, los niveles de glucosa, lactato triglicéridos y proteínas, en la hemolinfa permiten conocer el uso que se le da a las fuentes de energéticas puntualmente y bajo condiciones específicas (Racotta y Hernández-Herrera., 2000; Sánchez *et al*., 2001; Pascual *et al*., 2003; Pérez-Jar *et al*., 2006; Sánchez-Paz *et al*., 2007; Sainz-Hernández *et al*., 2008; Sánchez-Campos *et al*., 2010; Aparicio-Simón *et al*., 2010).

Por otra parte, los cambios en los factores ambientales también modifican los patrones de osmorregulación de los individuos (Charmantier y Anger 1999). La osmorregulación es un proceso que ocurre para mantener una diferencia entre la osmoconcentración de los fluidos corporales y la del ambiente (gradiente osmótico) (Dorgelo, 1981). Para medir lo anterior se ha propuesto a la capacidad osmorreguladora (CO), definida como la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y el medio externo a una salinidad dada (Lignot *et al*., 2000).

Todos estos ajustes fisiológicos en crustáceos están sujetos a coordinación vía neuroendocrina (Fingerman, 1994; Fingerman, 1997; Lago-Lestón *et al*., 2007).

II.2 Sistema neuroendocrino en crustáceos

Los crustáceos han desarrollado un sistema neuroendocrino complejo, que involucra elementos reguladores, que son capaces de actuar a corto, mediano y largo plazo, permitiéndoles responder a factores externos mediante el ajuste de las funciones vitales (Keller, 1992). Los principales centros que conforman este sistema, se encuentran distribuidos en el pedúnculo ocular, y en los ganglios subesofágico, torácico y abdominal (Fig. 3) (Laufer *et al*., 1991; Fanjul-Moles, 2006).

En decápodos, el centro neuroendocrino más importante corresponde al complejo órgano X-glándula del seno (OX-GS), localizado en los pedúnculos oculares (Fig. 4). Las neurohormonas del pedúnculo ocular controlan numerosos procesos fisiológicos; estas son sintetizadas por un cúmulo de neuronas especializadas en la secreción (neurosecretoras) denominado órgano X (OX), para posteriormente ser transportadas vía axones hasta las terminales nerviosas que forman una estructura compacta denominada glándula del seno (GS), este órgano neurohemal almacena y libera las neurohormonas de manera regulada (Serrano *et al*., 2004).

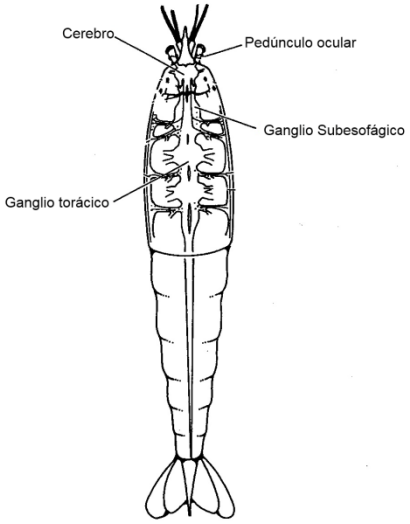

Figura 3. Principales centros neuroendocrinos en crustáceos (Laufer *et al*., 1991).

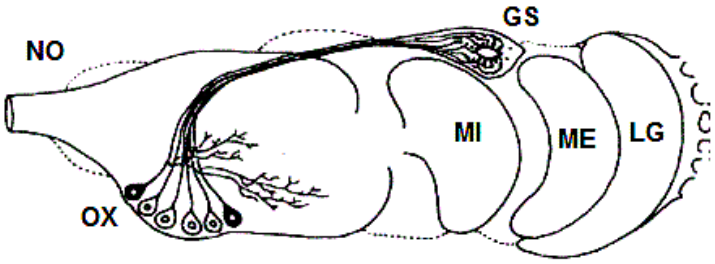

Figura 4. Localización del complejo órgano X-glándula del seno en el pedúnculo ocular de crustáceos decápodos (vista dorsal). LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminalis; NO, nervio óptico; GS, glándula del seno; OX, órgano X (Serrano *et al*., 2004).

II.3 Neurohormonas del complejo OX-GS

Actualmente, se han aislado una gran variedad de neuropéptidos del complejo OX-GS, los cuales poseen cierto grado de homología de secuencias, y sobrelapamiento en algunas funciones biológicas. Estos neuropéptidos han sido agrupados dentro de la familia peptídica CHH/MIH/GIH, la cual incluye a la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) o hormona inhibidora de las gónadas (GIH), la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) y a la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH). Estas neurohormonas inducen respuestas relacionadas con procesos reproductivos, crecimiento, desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Serrano *et al*., 2004).

Los miembros de la familia de neurohormonas CHH/MIH/GIH son péptidos con un tamaño de 72-78 aminoácidos y un peso de 8-11 kDa, los cuales comparten una considerable homología en secuencia y estructura. Por ejemplo, se caracterizan por presentar un núcleo conservado de 66 aminoácidos en el péptido maduro y seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro, los cuales estabilizan su estructura globular (Chen *et al*., 2005; Hsu *et al*., 2006).

La familia se subdivide en dos grupos: el grupo de la CHH, también llamado subfamilia CHH I y el grupo MIH/GIH/MOIH ó subfamilia CHH II. Las preprohormonas de ambas subfamilias, son sintetizadas con una secuencia señal

N-terminal y son procesadas proteolíticamente para su maduración. En el caso de los precursores de la subfamilia CHH I, estos presentan una secuencia peptídica relacionada al precursor de CHH (CPRP), el cual tiene un sitio de hidrólisis dibásico con localización N-terminal en relación a la secuencia del péptido maduro, el cual tiene una secuencia de 72-74 aminoácidos. Los miembros de este grupo también pueden requerir otras modificaciones postraduccionales, como la amidación del C-terminal y la L o D isomerización. Los miembros de la subfamilia CHH II carecen de la secuencia CPRP y del sitio de hidrólisis dibásico, además de presentar una glicina en la posición 12 del péptido maduro (Fanjul-Moles, 2006; Zarubin *et al*., 2009).

Para poder estudiar los efectos fisiológicos de las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH en camarones es necesario extraerlas de las glándulas del seno ubicadas en los pedúnculos oculares. Sin embargo, debido a la poca cantidad que se obtiene de cada glándula es necesario llevar a cabo la extracción de glándulas de una gran cantidad de organismos. Asimismo, su purificación se dificulta por la similitud en tamaños y estructuras entre las neurohormonas de esta familia. Una alternativa a este problema es la producción de neurohormonas recombinantes ya que una vez clonadas en vectores de expresión, es posible obtener las cantidades necesarias de una forma rápida y sencilla.

II.4 Hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH)

CHH es la neurohormona más abundantemente producida en el órgano X. Su función principal, es estimular la hidrólisis del glucógeno (glucogenólisis) en algunos tejidos como músculo y hepatopáncreas, lo cual ocasiona una elevación en los niveles de glucosa en la hemolinfa, condición conocida como hiperglucemia (Chang *et al*., 1998; Böcking *et al*., 2002; Lago-Lestón *et al*., 2007). Esta neurohormona, es sintetizada principalmente en el pericarión de las neuronas que forman la *medulla terminalis* del órgano X (OX), y es secretada en las terminales axónicas bulbosas dentro de la glándula del seno (GS) (Giulianini *et al*., 2002).

Sin embargo, aunque el complejo OX-GS es considerado el principal tejido secretor de CHH, en algunas especies de crustáceos se ha aislado ADNc de CHH's, o se ha logrado detectar la neurohormona en otras estructuras, como el órgano pericárdico, cordón ventral, y los ganglios torácicos y abdominal (Keller; 1992; Chang *et al*., 1990, De Kleijn y Van Herp 1995., Escamilla-Chimal *et al*., 2001).

El efecto diabetogénico producido por la CHH ha sido ampliamente documentado en decápodos como una respuesta al estrés, debido a muchas fuentes como: hipoxia, cambios de salinidad y temperatura, exposición a metales pesados, lipopolisacáridos bacterianos, entre otros. Lo anterior proporciona evidencia de que en crustáceos esta neurohormona ejerce un efecto importante en la respuesta al estrés, y es un mecanismo altamente regulado para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos (Chang *et al*., 1998; Chang *et al*., 1999; Lorenzon *et al*., 2004; Lorenzon *et al*., 2005; Lago-Lestón, 2007).

Aunque la principal función de CHH es la regulación del metabolismo de la glucosa, esta neurohormona tiene una función pleiotrópica ya que además de regular el metabolismo de la glucosa está involucrada en la regulación de otros procesos fisiológicos como la estimulación del metabolismo de lípidos (hiperlipidemia), la osmorregulación, la inhibición de la síntesis de ecdisteroides en el órgano Y, de la síntesis de proteínas y vitelogénesis en ovarios, y del metil farnesoato (MF) en el órgano mandibular. Sin embargo, se piensa que debe tener otros órganos blanco debido a que eleva los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc) en una gran variedad de tejidos (Böcking *et al*., 2002; Chung y Webster, 2003; Treerattrakool *et al*., 2006).

Además se ha observado el sobrelapamiento de su actividad con las de otros miembros de la familia CHH/MIH/GIH, aunque estas funciones son poco claras. Por ejemplo, al estudiar *in vitro* e *in vivo* las hormonas CHH-I y CHH-II del langostino *Procambarus clarkii*, las cuales difieren por la presencia de D (CHH-II) y L (CHH-I) fenilalanina en la posición 3 del péptido, estas hormonas mostraron actividad hiperglucémica e inhibidora de la síntesis de ecdiesteroides (Yasuda *et*

al., 1994). También un péptido CHH aislado de *H. americanus* registró actividad hiperglucémica así como inhibidora de la muda (Chang *et al*., 1990).

Como puede apreciarse en la figura 5, el mecanismo de regulación de la secreción de la CHH precisa un sistema de regulación negativa. El desencadenamiento de una respuesta inhibitoria ante la D-glucosa en la hemolinfa, ocasiona que las células del complejo OX-GS se hiperpolaricen debido a la activación de una corriente de K^+ inhibiendo la liberación de CHH. Cuando se está en un estado hipoglucémico, donde se favorece la formación de lactato, y en respuesta a un estímulo externo o interno se produce una despolarización de las membranas de las células lo cual permite la secreción de CHH a sus órganos blanco donde estimula la degradación de glucógeno (Fanjul-Moles, 2006).

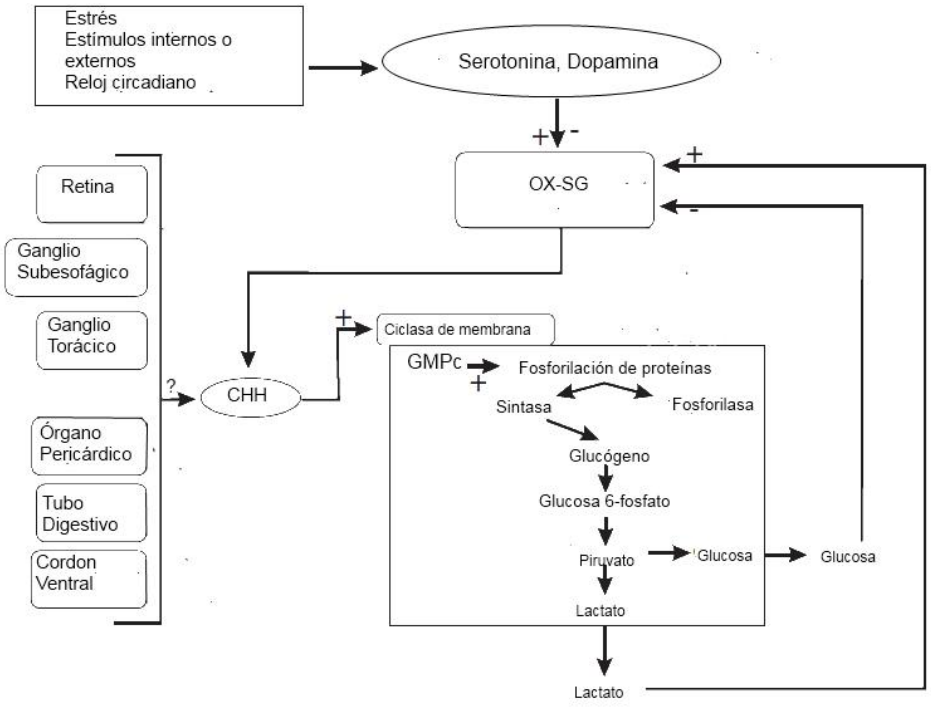

Figura 5. Regulación de la secreción de la CHH. +, estimulación; -, inhibición (Fanjul-Moles 2006).

El efecto hiperglucémico producido por la CHH ha sido ampliamente documentado en decápodos como una respuesta al estrés, debido a muchas fuentes como: hipoxia, cambios de salinidad y temperatura, exposición a metales pesados, lipopolisacáridos bacterianos, entre otros (Chang *et al*., 1998; Chang *et al*., 1999; Lorenzon *et al*., 2004; Lorenzon *et al*., 2005; Lago-Lestón *et al*., 2007).

II.5 Isoformas de CHH

El ADNc de la neurohormona CHH ha sido clonado y secuenciado en varias especies de crustáceos, entre las que se encuentran *Homarus americanus* (Tensen *et al*., 1991), *Nephrops norvergicus* (Mettulio *et al*., 2004), *Jasus lalandii* (Marco *et al*., 2003), *Cancer pagarus* (Chung *et al*., 1998), *Carcinus maenas* (Kegel *et al*., 1989; Dircksen *et al*., 2001), *Gecarcinus lateralis* (Lee *et al*., 2007), *Orconectes limosus* (Kegel *et al*., 1991), *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al*., 1993), *Procambarus clarkii* (Yasuda *et al*.,1994), *Macrobranchium rosenbergii* (Chen *et al*., 2004), *Penaeus japonicus* (Ohira *et al*., 1997), *Penaeus monodon* (Udomkit *et al*., 2004), *Metapenaeus ensis* (Gu *et al*., 2000), *Litopenaeus schmitti* (Huberman *et al*., 2000) y *L. vanamei* (Lago-Lestón *et al*., 2007).

El grupo de neurohormonas CHH's se caracterizan por la presencia de isoformas especie específicas (Böcking *et al*., 2002). Algunas isoformas son producidas mediante modificaciones a nivel postraduccional, que involucran la isomerización D/L del residuo fenilalanina en la posición 3 (Yasuda *et al*., 1994; Aguilar, *et al*., 1995; Serrano, *et al*., 2003). También se han purificado isoformas cuya única diferencia es la formación de un piroglutamato en una de las isoformas (Hsu *et al*., 2008).

Así mismo se han descrito isoformas de CHH codificadas por distintos genes. En *H. americanus* y *C. destructor* se han descrito dos variantes (Tensen *et al*., 1991; Bulau *et al*., 2003), cinco para *P. monodon* (Davey *et al*., 2000) y seis para *P. japonicus* (Yang *et al*., 1997; Khayat *et al*., 1998). Existen también otras variantes originadas por corte y empalme alternativo del gen que las codifica. El cangrejo *C. maenas* presenta dos variantes de CHH de este tipo, una localizada

en el complejo OX-SG, nombrada como Cam-CHH o Cam-SG-CHH y otra en los órganos pericárdicos nombrada Cam-PO-CHH (Dircksen *et al*., 2001). También se han reportado dos isoformas CHH por corte y empalme alternativo en *M. rosenbergii*, Mar-CHH la cual se expresa en OX-GS y Mar-CHH-L encontrada en branquias, corazón, glándula antenal y ganglios torácicos (Chen *et al*., 2004).

Existen evidencias de que las fluctuaciones en la liberación de la neurohormona CHH a la hemolinfa parecen estar reguladas por cambios en la neuroregulación central de acuerdo a influencias ambientales y endógenas. Los principales componentes de la neuroregulación lo constituyen las aminas biogénicas, las cuales son moléculas señalizadoras en el sistema nervioso de los organismos multicelulares que funcionan como neurotransmisores o neuromoduladores (Sneddon *et al*., 2000).

II.6 La dopamina como neuromodulador en crustáceos

La dopamina es una amina biogénica, las cuales son compuestos nitrogenados formados principalmente mediante la descarboxilación de los aminoácidos, y mediante la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Estos compuestos, son producto del metabolismo de los seres vivos (Karovičová y Kohajdová, 2005).

Son moléculas relacionadas con la comunicación intercelular, algunas de ellas funcionan como neurotransmisores o neuromoduladores. Un neurotransmisor es una molécula que transfiere la información de neurona a neurona a través de la sinapsis, excitando a una célula presináptica a que lleve a cabo una acción, o inhibiendo su actividad; mientras que un neuromodulador es liberado de una neurona solo para amplificar o disminuir la actividad de una o más neuronas. Las aminas biogénicas relacionadas con estos tipos de actividad son principalmente las que corresponden al grupo de las catecolaminas y la serotonina (5-HT) (Von Bohlen y Dermietzel, 2006; Fingerman *et al*., 1994).

Las catecolaminas son la dopamina, epinefrina (adrenalina) y noraepinefrina (noradrenalina), y se nombran de esta manera debido a que

contienen un grupo catecol en su estructura. Estas sustancias son derivadas de un precursor común, el aminoácido tirosina.

La dopamina se encuentra distribuida ampliamente en el sistema nervioso de crustáceos. Mediante métodos histoquímicos e inmunoensayos se han localizado neuronas dopaminergénicas en el ganglio óptico, ganglio central, ganglio subesofágico, intestino y órgano pericárdico (Alvarado-Álvarez *et al*., 2005). Esta amina biogénica tiene un amplio espectro de efectos fisiológicos, como, el promover la liberación de la hormona concentradora del pigmento rojo en *Uca pugilator* y *Macrobrachium ohione*, en el control de los cromatóforos en *U. pugilator*, en la regulación de la frecuencia del ritmo cardiaco en *Astacus leptodactylus, Eriphia spinifrons*, *Aniculus aniculus*, *Dardanus crassimanus*, *Portunus sanguinolentus* y *podophthalmus vigil*. La dopamina también está involucrada en el control del movimiento y actividad intestinal en *Cancer borealis*, y en la inhibición de la actividad locomotora en *Gecarcinus lateralis* (Fingerman *et al*., 1994).

Algunos estudios proponen que la dopamina tiene una función importante en la osmorregulación. En *Carcinus maenas* se ha observado una disminución de los niveles de dopamina en la hemolinfa y un aumento de los niveles en las branquias bajo estrés hiposmótico (Zatta, 1987). En *Eriocheir sinensis* (Mo *et al*., 1998), *Birgus latro* (Morris *et al*., 2000) y *Chasmagnathus granulatus* (Halperin *et al*., 2004) la dopamina ha mostrado un efecto sobre el intercambio iónico en las branquias vía AMPc posiblemente mediante la modificación de la actividad Na^+/K^+ ATPasa.

Su efecto sobre los niveles de glucosa y sobre la secreción de CHH parece ser especie específica. En *Carcinus maenas* (Lüschen *et al*., 1993) *Penaeus monodon* (Kuo *et al*., 1995; Chang *et al*., 2007) y *Procambarus clarkii* (Zou *et al*., 2003) se reporta hiperglucemia y aumento de los niveles de CHH en hemolinfa de manera dosis dependiente tras la inyección de dopamina, y estos efectos no se observan en organismos con ablación del pedúnculo ocular. Sin embargo, en el caso de *Procambarus clarkii* existe un estudio *in vivo* que señala que la dopamina

tiene un efecto hipoglucémico, la cual *in vitro* inhibe la liberación de CHH del tejido neuroendocrino en el pedúnculo ocular (Sarojini *et al*., 1995). A la fecha, se desconoce la razón para estos resultados dispares en este organismo. La hipoglucemia e inhibición de la liberación de CHH mediada por la dopamina también ha sido observada en *Palaemon elegans* (Lorenzon *et al*., 2005).

Adicionalmente al efecto de la inyección de este neuromodulador en los niveles de glucosa de *P. monodon*, Chang *et al*., (2007) observaron cambios en los niveles algunas variables respiratorias (lactato, pO_2, pCO_2, HCO_3^-, TCO_2, oxihemocianina, pH) y de osmorregulación (iones Na^+ y K^+ y osmolaridad de la hemolinfa), sugiriendo que la dopamina tiene un papel importante como neurotransmisor en el metabolismo energético, modulación de la respiración y en el balance ácido-base en esta especie

Toda esta evidencia enfatiza que la acción conjunta de neurohormonas como la CHH y de la dopamina, regulan algunos procesos de la fisiología a nivel neuroendocrino en crustáceos. Esto destaca la importancia de su estudio en con relación a factores endógenos, a fin de conocer los mecanismos efectores de ambos elementos y las respuestas generadas como consecuencia.

II.7 CHH's de *Litopenaeus vannamei*

En *L. vannamei* se han encontrado dos genes que codifican para tres neurohormonas diferentes. Uno de los genes (*chhB*) da lugar a dos neurohormonas diferentes por medio de corte y empalme alternativo, la CHH-B1 y CHH-B2 (Fig. 6), mientras que el otro gen (*chhA*) genera la tercera neurohormona nombrada como CHH-A (Lago-Lestón *et al*, 2007). Las tres neurohormonas tienen un alto grado de homología con otras CHH's y presentan regiones características en las CHH's, por lo cual han sido nombradas como hormonas hiperglucémicas de crustáceos.

A la fecha se ha estudiado la expresión de las tres isoformas a nivel de ARNm, encontrándose en el caso de CHH-B1 una mayor expresión a

combinaciones de salinidad-temperatura de 16 ‰ - 26 °C, y 40 ‰ – 32 °C (Lago-Lestón *et al*., 2007). También se ha encontrado que además del pedúnculo ocular, se expresa en las branquias posteriores (Sigala-Andrade, 2010). Esto proporciona evidencia de la posible intervención de la neurohormona en la osmorregulación.

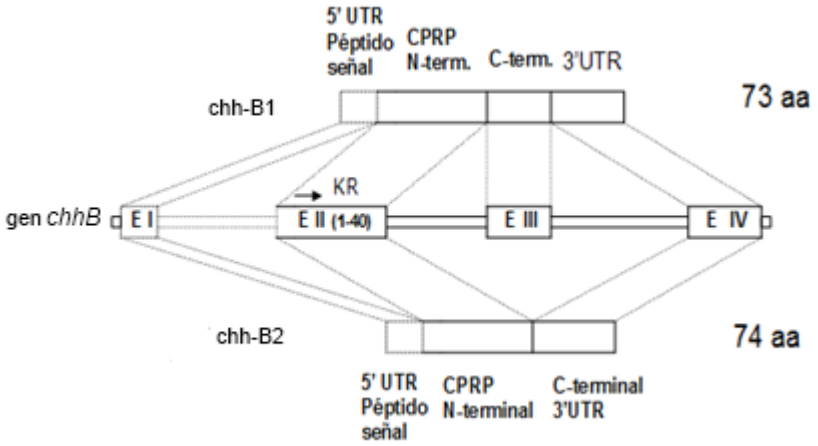

Figura 6. Estructura del gen *chhB* y sus dos transcritos producidos por corte y empalme alternativo, chh-B1 y chh-B2. E, Exón; CPRP, Péptido Relacionado con el Precursor de CHH; UTR, Región no traducida (modificado de Lago-Lestón *et al*., 2007).

Para facilitar el estudio funcional de los neuropéptidos, los ADNc de las tres neurohormonas ya han sido clonados y expresadas en *Pichia pastoris* (López-Rodríguez, 2009; Sánchez-Castrejón, 2007; Sánchez-Castrejón *et al*., 2008).

Además, se ha realizado un bioensayo para determinar si la neurohormona CHH-B1 recombinante con el C-terminal adicional tiene actividad hiperglucémica e inhibidora de la muda como sucede con la CHH de otros crustáceos. Sin embargo, solo se detectó actividad hiperglucémica y no inhibió el proceso de muda por lo que es posible que el C-terminal interfiera en dicha actividad (Sánchez-Castrejón *et al*, 2008). En este sentido algunos autores han sugerido, pero no confirmado, que el sitio funcional de la actividad inhibidora de la muda está localizado en la región C-terminal de las neurohormonas.

II.8 Dopamina como modulador fisiológico en *Litopenaeus vannamei*

Las prácticas acuícolas, a menudo son fuente de estrés lo cual altera la homeostasis de los organismos afectando el crecimiento, reproducción y haciéndolos más susceptibles a enfermedades. En crustáceos, se sabe que en condiciones de estrés ocurren modificaciones en ciertas variables metabólicas para satisfacer la demanda energética impuesta en ese momento, y todos esos ajustes están determinados por modificaciones en la actividad del sistema neuroendocrino, el cual a su vez depende de otros componentes que regulan su funcionamiento como lo son las aminas biogénicas, cuya secreción constituye una respuesta primaria al estrés en crustáceos (Aparicio-Simón *et al*., 2010).

El estudio de las respuestas metabólicas al estrés en *L. vannamei* ha cobrado importancia en las últimas décadas al ser una especie de gran importancia económica para la acuicultura global, ya que su conocimiento podría servir para la mejora de las condiciones de cultivo. Sin embargo, existen pocos trabajos que tratan de elucidar el papel de la dopamina como uno de los primeros mediadores en las respuestas fisiológicas en *L. vannamei*.

En esta especie se ha se ha estudiado el efecto de la dopamina sobre la modulación de algunas respuestas fisiológicas transitorias. Chiu *et al*. (2006), observaron en juveniles aclimatados a 27 °C y 20 ‰, que la inyección de dopamina en dosis ≤10^{-6} moles/camarón, produce un aumento temporal en los niveles de la osmolaridad, glucosa, lactato, Na^{+}, Cl^{-}, proteínas, una reducción en la hemocianina, lo cual indicó que este neurotransmisor tiene una función importante en la modulación del metabolismo energético y por lo tanto, en la regulación de la respiración y osmorregulación.

Liu *et al*. (2008) observaron que en adultos aclimatados a 24 °C y 26 ‰ que la inyección de dopamina tuvo un efecto transitorio dosis dependiente sobre la concentración de aminoácidos libres en hemolinfa. Los aminoácidos encontrados en mayor abundancia fueron alanina, glicina, arginina, prolina, lisina, los cuales son considerados efectores osmóticos en crustáceos. Asimismo, a una mayor concentración de dopamina se observó un aumento en la concentración de

proteínas y una disminución en la hemocianina, lo cual indicó que estaba involucrada en la modulación de las respuestas osmorregulatorias.

Aparicio-Simón *et al*. (2010) señalan que en juveniles aclimatados a 25 °C y 39 ‰ el lactato en la hemolinfa (producto del metabolismo anaerobio), podría ser una señal metabólica mediada por la secreción de catecolaminas (en particular la dopamina) en el pedúnculo ocular para estimular la secreción de CHH y activar la hiperglucemia en hemolinfa.

Aunque es claro que la dopamina tiene una amplia gama de efectos sobre la osmorregulación y metabolismo en *L. vannamei* aún falta información acerca de su función bajo otras condiciones ambientales y estadios del ciclo de vida. En este sentido es posible que funcione a su vez como señal para la secreción de neurohormonas como las CHH's de *L. vannamei*.

Por lo tanto, la evaluación de las respuestas fisiológicas como consecuencia de la acción de sustancias neuromoduladoras como las aminas biogénicas (por ejemplo, la dopamina) y neurohormonas como la CHH podrían constribuir a un mayor conocimiento acerca de su función bajo distintas condiciones ambientales o nutricionales, y podría ser de utilidad para conocer si existe alguna relación funcional entre ambas no solo en *L. vannamei* sino en crustáceos en general, contribuyendo no solo al conocimiento acerca del control neuroendocrino en el camarón blanco sino en crustáceos en general.

III. Justificación

Dada la importancia del camarón blanco *L. vannamei* como recurso acuícola a nivel mundial, el conocimiento de su fisiología juega un papel importante en la mejora de las condiciones de cultivo ya que a menudo los organismos se encuentran sometidos a estrés, lo cual limita su crecimiento, maduración y supervivencia. Los crustáceos han desarrollado un sistema neuroendocrino complejo, que les permite responder a factores externos mediante el ajuste de las funciones vitales. Entre las neurohormonas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH, la hormona hiperglucémica de crustáceos es la más abundante. Aunque ya se ha comprobado que la CHH-B1 de *L. vannamei* tiene actividad hiperglucémica, esta hormona se ha relacionado con otros procesos importantes como el metabolismo de lípidos, osmoregulación y reproducción. Por otro lado, existen evidencias de que las aminas biogénicas, como la dopamina, tienen un papel modulador sobre algunas respuestas fisiológicas y metabólicas de peneidos en algunas condiciones de estrés, sin embargo los resultados con los que se cuenta en ocasiones son poco claros. En el caso particular de *L. vannamei,* las respuestas fisiológicas a la temperatura y la salinidad resultan de gran importancia para el crecimiento, maduración y reproducción de la especie. Sin embargo, a la fecha no existen estudios realizados para evaluar el efecto de la dopamina sobre diferentes variables metabólicas y fisiológicas en condiciones hiper-osmóticas y su relación con la neurohormona CHH. En este sentido, el presente trabajo busca conocer la función de la dopamina y de la neuhormona recombinante CHH-B1 (con un C-terminal adicional) en la regulación metabólica y la respuesta osmoregulatoria en *L. vannamei* mediante la realización de ensayos *in vivo* y la posterior evaluación de diferentes respuestas fisiológicas. Esto aumentará el conocimiento de la neuroendocrinología de la especie y sentará las bases para ensayos posteriores bajo distintas condiciones ambientales y/o nutricionales, permitiendo a futuro desarrollar herramientas que permitan modular el estrés en organismos en cultivo y mejorar los rendimientos de producción.

IV. Hipótesis

La dopamina provocará la movilización de reservas de energía a la hemolinfa en *L. vannamei*, así como un aumento en la osmolaridad y una disminución en la cantidad de oxihemocianina.

La neurohormona recombinante CHH-B1 provocará un efecto metabólico en *L. vannamei* principalmente mediante el aumento de los niveles de glucosa, así como una modificación en la osmolaridad en la hemolinfa.

V. Objetivos

V.1 Objetivo general

Estudiar el papel de la dopamina y de la neurohormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (CHH-B1) en la modulación de respuestas fisiológicas en la hemolinfa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei.*

V.2 Objetivos específicos

Llevar a cabo la integración de pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de *Pichia pastoris* para la expresión de CHH-B1 nativa.

Expresar y purificar a las neurohormonas recombinantes CHH-B1 nativa y a CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional (epítopo *c-myc* y región 6xHis).

Evaluar el efecto de la inyección de dopamina y de la neurohormona CHH-B1 sobre la osmolaridad y la capacidad osmorreguladora en sub-adultos de camarón blanco.

Evaluar el efecto de dopamina y CHH-B1 sobre los niveles de oxihemocianina y de algunas variables metabólicas en hemolinfa del camarón blanco.

VI. Materiales y Métodos

VI.1 Integración de la construcción pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de *Pichia pastoris*

Para la construcción de la cepa de *P. pastoris* que expresara la neurohormona CHH-B1 nativa se procedió a integrar la secuencia de la neurohormona CHH-B1 nativa en el genoma de la cepa KM71 de *P. pastoris*, la cual tiene un fenotipo Mut^S. Para ello, se utilizó el vector pPicZαA/CHH-B1 previamente construido por Sánchez-Castrejón (2007) el cual contiene el ADNc del péptido maduro de CHH-B1 clonado en fase de lectura con el factor de secreción (α-Factor). Este plásmido fue transformado en la cepa TOP10F' de *Escherichia coli* dando lugar a la cepa TOP10-CHH-B1, la cual fue almacenada a -80 ^oC.

VI.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico

A partir de la cepa TOP10-CHH-B1 se sembró una asada en una placa de LB-agar 1.5% (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, agar 1.5%, pH 7.5) con Zeocina (Invitrogen) (100 mg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche. A partir de esta placa, se inoculó una colonia fresca en 3 ml de medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.5) con Zeocina (Invitrogen) (100 mg/ml) y se incubó a 37 °C y 300 rpm durante toda la noche.

A partir de este cultivo se extrajo el ADN plasmídico por el método modificado de lisis alcalina (Bimboim y Doly, 1979) (anexo A.1). La calidad de la extracción fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en solución amortiguadora Tris Borato-EDTA (TBE) 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) y teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y cuantificado en el espectrofotómetro nanodrop NanoVue (GE Healthcare), a 260 nm. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

Para comprobar que el plásmido contiene la construcción correcta de CHH-B1 se llevó a cabo la amplificación, por el método de reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), de una región comprendida entre la secuencia que codifica la señal de secreción α-Factor del péptido y el extremo 3' del promotor *AOX1*, entre las cuales esta clonada la secuencia para CHH-B1 la Los oligonucelótidos utilizados fueron el α-Factor (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTG-3') y 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'), los cuales amplifican un producto de 465 pb. Se realizaron dos reacciones con un volumen de 25 µl cada una, las cuales contenían Tris-HCl (20 mM, pH 8.4), KCl (50 mM), oligonucleótido α-Factor (0.4 µM), oligonucleótido 3'AOX1 (0.4 µM), $MgCl_2$ (2 mM), dNTPs (0.2 mM), enzima *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) (0.625 U) y una colonia como ADN templado. Se incluyó un control negativo de la reacción sin templado. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 30 ciclos a 95 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TBE 1X y teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

VI.1.2 Linearización del plásmido pPICZαA/CHH-B1

Debido a que para la inserción de la construcción de CHH-B1 en el genoma de *Pichia* se requiere linearizar el plásmido completo o en su caso amplificar todo el plásmido. En este trabajo se optó por amplificar el plásmido completo por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos PicFor (5'-GGTTTCTGAGTGTGGGGTC-3') y PicRev (5'-CTCATCTGGAGTGATGTTCG-3') que hibridan dentro de la secuencia 5'*AOX1* del vector que promueve la recombinación con el genoma de la levadura. Las reacciones se prepararon siguiendo el protocolo modificado de López-Rodríguez, (2009).

El volumen de cada reacción fue de 25 µl (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, KCl 100 mM, oligonucleótido PicFor 0.4 µM, oligonucleótido PicRev 0.4 µM, $MgCl_2$ 1.2 mM, dNTPs 0.2 mM, enzima iProof ADN polimerasa de alta fidelidad (BIO-RAD) (0.5 U)) incluyendo 3.65 µl de ADN templado (150 ng). Como control negativo de la reacción se incluyó una reacción de PCR sin ADN. Las condiciones de reacción

fueron de 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, 30 ciclos de 30 s a 98 °C, 30 s a 60 °C, 3.5 min a 72 °C y 1 ciclo de extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Para eliminar productos inespecíficos, los fragmentos correspondientes al plásmido se cortaron del gel y se purificaron por medio de fenol congelado (anexo A.2). La purificación fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El ADN purificado del gel fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro nanodrop NanoVue (GE Healthcare), a 260 nm y se almacenó a -20 °C hasta que se llevó a cabo la transfección de *P. pastoris*.

VI.1.3 Transfección a *P. pastoris*

Antes de llevar a cabo la transfección de pPicZαA/CHH-B1 a la cepa KM71 de *P. pastoris* se prepararon células electrocompetentes según el protocolo descrito por el manual EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) (anexo A.3). La transfección del plásmido linearizado fue llevada a cabo por electroporación (anexo A.4), utilizando 5 µg del vector resuspendido en un volumen de 13 µl.

De las colonias que crecieron en YPDS-agar 1.5% con Zeocina (Invitrogen) (100 µg/ml) producto de la transfección, se seleccionaron 42 y se resembraron en placas con YPD-agar 1.5% con Zeocina (Invitrogen) (100 µg/ml). De estas colonias se eligieron 10 al azar para realizar un análisis de PCR con los oligonucleótidos α-Factor y 3’AOX1 a fin de confirmar la integración de la construcción en el genoma de *P. pastoris*. Primero, se elaboraron los lisados celulares de cada colonia, se tomó una porción de cada colonia con un palillo estéril, y se resuspendieron cada una en 10 µl de agua destilada estéril con 5 µl de liticasa (5 U/µl) (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y posteriormente a -80 °C durante 20 min. Las reacciones de PCR se elaboraron según lo descrito en el apartado VI.1.1, solo que esta vez se utilizó

como ADN templado, 2.5 µl de lisado celular de cada colonia. También, se incluyó una reacción como control negativo del PCR sin ADN y una reacción con lisado celular de una colonia sin inserto como control negativo de la transfección. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TBE1X y teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

De las colonias que dieron positivo se seleccionaron dos, y se realizaron dos reacciones de PCR por cada clona para su posterior purificación y análisis de secuencia. Las reacciones de PCR se realizaron esta vez utilizando los oligonucleótidos 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') y 3'AOX1. El volumen completo de cada reacción de PCR fue de 25 µl (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, KCl 100 mM, oligonucleótido 5'AOX1 0.4 µM, oligonucleótido 3'AOX1 0.4 µM, $MgCl_2$ 1.2 mM, dNTPs 0.2 mM, enzima iProof DNA polimerasa de alta fidelidad (BIO-RAD) (0.5 U) incluyendo 2.5 µl del lisado celular de cada colonia Las condiciones de reacción fueron de 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, 30 ciclos de 30 s a 98 °C, 30 s a 58 °C, 1:30 min a 72 °C y 1 ciclo de extensión final de 7 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit PureLink PCR purification (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y fueron enviados a secuenciación (SeqxCel, San Diego, CA, USA).

La secuencia de la neurohormonas obtenidas de las colonias analizadas fueron comparadas con la secuencia de CHH-B1 de *L. vannamei* mediante un análisis de alineamientos múltiples con el software MULTALIN (http://multalin.toulouse.inra.fr/) (Corpet, 1988).

VI.2 Expresión y purificación de las neurohormonas CHH-B1 nativa y CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional

Para llevar a cabo la expresión de la neurohormona CHH-B1 se decidió seguir dos estrategias distintas con el objetivo de obtener la mayor cantidad posible de proteína recombinante. La primera consistió en llevar a cabo la expresión de la

neurohormona en su forma nativa. La segunda, en expresar a CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional (CHH-B1$_{His}$), el cual está compuesto por el epítopo *c-myc* para su inmunodetección por anticuerpos y una cola de polihistidinas (6xHis) para su purificación mediante cromatografía de afinidad. El C-terminal adicional de la proteína recombinante está precedido por un sitio de hidrólisis para la enzima enterocinasa (EK).

Para la realización de ensayos *in vivo* se busca evaluar la actividad biológica de neurohormonas recombinantes y su efecto en las respuestas fisiológicas. Es deseable la utilización de la forma nativa de la neurohormona para evitar cualquier efecto adicional de las regiones fusionadas en el C-terminal de la neurohormona que interfiera con su actividad biológica. Sin embargo, debido a que la neurohormona recombinante con el C-terminal adicional ya ha probado tener actividad hiperglucémica en ensayos *in vivo* (Sánchez-Castrejón, 2007), en el presente trabajo se decidió llevar a cabo la expresión de ambas versiones de CHH-B1 (nativa y con el extremo C-terminal adicional).

VI.2.1 Expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa en la levadura *Pichia pastoris*

VI.2.1.1 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa

La cepa KM71/CHH-B1 fue sembrada en una placa con medio YPD-agar 1.5% con Zeocina (100 µg/ml), e incubada a 30 °C hasta observar la presencia de colonias. A partir de esta placa se tomó una asada de colonias frescas para inocular un tubo con 3 ml de medio YPD con Zeocina (100 µg/ml), el cual fue incubado a 30 °C y 250 rpm durante 18 h. Posteriormente, 1 ml del cultivo anterior fue inoculado en un matraz con 500 ml de medio BMGY (extracto de levadura 1%; peptona 2%; fosfato de potasio 100 µM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina 4x10^{-5}%; glicerol 1%), el cual se incubó bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta que alcanzó una DO$_{600}$= 4.

Se cosecharon 250 ml en 5 tubos cónicos con 50 ml de cultivo cada uno. Estos fueron centrifugados a 2,000 x *g* durante 5 min. El procedimiento se repitió con los 250 ml restantes del cultivo en medio BMGY. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió por vórtex en 30 ml de agua destilada estéril, después se agregaron otros 20 ml de agua destilada estéril, y de nuevo se agitó por vórtex, se centrifugó durante 5 min. El contenido de cada tubo fue resuspendido en 20 ml de medio BMMY (extracto de levadura 1%; peptona 2%; fosfato de potasio 100 µM, pH 6.0; YNB 1.34%; biotina $4x10^{-5}$%; metanol 0-4%) y colocados en matraces de 150 ml. A cada matraz se le adicionó metanol al 100% a una concentración distinta: 0, 1, 2 y 4% (v/v). Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 250 rpm durante 5 días, periodo durante el cual se tomó diariamente y por duplicado una muestra de 1 ml. Cada muestra colectada, inmediatamente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a -80 °C para su análisis posterior. Diariamente después de tomar las muestras del cultivo se adicionó metanol a la concentración correspondiente para mantener la inducción.

VI.2.1.2 Precipitación de proteínas

Para precipitar las proteínas contenidas en los sobrenadantes del cultivo y analizarlas en electroforesis en geles de acrilamida, se agregó 150 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% a cada muestra de 1 ml de sobrenadante y se incubaron a 4°C durante 12 h. Después, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante fue descartado. El pellet de los tubos se lavó agregando 1 ml de acetona fría al tubo y mezclando por inversión, nuevamente se centrifugó bajo las condiciones anteriores. El sobrenadante fue descartado y la acetona del pellet fue evaporada. Finalmente, el pellet se resuspendió en 23 µl de amortiguador de carga 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%).

VI.2.1.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (Tricina-SDS-PAGE)

La expresión de proteínas durante el ensayo de inducción se analizó en geles de poliacrilamida al 16.5% de acuerdo a la metodología propuesta por Schägger y Von Jagow (1987) (anexo A.5) para proteínas para proteínas cuyo peso molecular cae en el rango de los 1-100 kDa. Antes de cargar las muestras en el gel se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min. La electroforesis se realizó a 150 V y 50 mA constantes durante aproximadamente 3 h, hasta que el frente del bromofenol alcanzó la base. Una vez terminado el corrimiento de los geles se procedió a incubarlos 1 h en solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%, acetato de amonio 100 mM). Posteriormente se tiñeron con solución de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.1%, etanol 40% y ácido acético 10%) durante 5-12 h en agitación constante. Después los geles fueron lavados 1 h en solución de destinción (etanol 40% y ácido acético 10%). Finalmente se incubaron 1 h en solución equilibrante (etanol 25% y glicerol10%). Los geles fueron colocados entre papel celofán para su documentación y preservación.

VI.2.2 Expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$ en la levadura *Pichia pastoris*

VI.2.2.1 PCR de colonia

Para la expresión de la neurohormona con un C-terminal adicional se partió de una cepa criopreservada a -80 °C (KM71/CHH-B1$_{His,}$), la cual se sembró en placas YPD-agar 1.5% con Zeocina (Invitrogen) (100 µg/ml).

Una vez que se observaron colonias en las placas, se eligieron algunas colonias aisladas para su análisis y se lisaron según lo descrito en el apartado VI.1.3.

Para comprobar que la cepa contiene la construcción de CHH-B1 con el C-terminal adicional, se procedió a realizar una amplificación por PCR utilizando los oligonucelótidos α-Factor y 3'AOX1 de acuerdo con lo descrito en el apartado

VI.1.1. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1X, el cual fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Una vez confirmada la presencia de la construcción para CHH-B1$_{His}$, se procedió a realizar la inducción de la expresión de la neurohormona recombinante.

VI.2.2.2 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$

Se realizó un ensayo para determinar las condiciones óptimas de expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$. Esto se realizó de acuerdo al procedimiento seguido para la neurohormona CHH-B1 nativa (apartado VI.2.1.1).

VI.2.2.3 Precipitación de las proteínas

Las proteínas de los sobrenadantes de cultivos se precipitaron utilizando TCA al 100%-acetona al 100% de acuerdo a la metodología descrita en el apartado VI.2.1.2.

VI.2.2.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (Tricina-SDS-PAGE)

Las muestras de proteína obtenidas de la cinética de expresión para CHH-B1$_{His}$ se analizaron utilizando geles de poliacrilamida al 16.5% de acuerdo a la metodología descrita en el apartado VI.2.1.3.

VI.2.2.5 Inmunodetección por Western Blot

Para confirmar la presencia de la proteína de interés en el análisis por Tricina-SDS-PAGE se realizó un Western blot. Para ello se realizó una electroforesis de proteínas bajo las condiciones descritas en el apartado VI.2.1.3, con la diferencia que esta vez se incluyeron dos controles positivos que consistían en dos proteínas recombinantes con la etiqueta de polihistidinas y cuya secuencia no está relacionada a CHH-B1$_{His}$. Una vez terminada la electroforesis se procedió a la detección de la proteína de interés con el anticuerpo Anti-*myc*-HRP (Invitrogen)

dado que CHH-B1$_{His}$ cuenta con el epítopo *c-myc* (-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-) contenido en el C-terminal de la proteína recombinante (anexo A.6).

VI.2.2.6 Escalamiento del cultivo

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión de CHH-B1$_{His}$, se procedió a realizar el escalamiento del cultivo para expresar en mayor cantidad a la neurohormona. Esto se realizó según la metodología descrita en el apartado VI.2.2.2, pero esta vez se llevó a cabo en un mayor volumen de medio BMMY (100 ml) por duplicado, y solamente en las condiciones determinadas como óptimas.

Antes de agregar el metanol se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a 2,000 x *g* durante 5 min, y el sobrenadante fue almacenado a -80 °C para análisis posteriores. Una vez concluida la inducción, el cultivo fue centrifugado a 2,000 x *g* durante 5 min y el sobrenadante fue almacenado a -80 °C. Los sobrenadantes tanto antes como después de la inducción fueron analizados por medio de Tricina-SDS-PAGE para verificar la presencia de la proteína recombinante.

VI.2.2.7 Purificación por cromatografía de afinidad

La proteína recombinante CHH-B1$_{His}$ fue purificada mediante cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo descrito por ProBond Purification System (Invitrogen) para condiciones nativas (anexo A7). De cada elución obtenida de la columna, se tomó una muestra de 50 µl a cada una de las cuales se le adicionó 950 µl de amortiguador salino de fosfatos: PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 1.8 mM, pH 7.4). Las muestras tomadas antes y durante el proceso de purificación fueron analizadas por Tricina-SDS-PAGE, y las fracciones que contenían a la neurohormona fueron almacenadas a -20 °C para su posterior concentración y cuantificación.

VI.2.2.8 Concentración de la proteína recombinante

La proteína obtenida en las fracciones se cargó en un concentrador (Orbital Bioscience) que retiene proteínas de peso molecular superior a los 9 kDa. El

concentrador fue centrifugado a 4,500 x *g* a 4 °C durante 35 minutos. Posteriormente se lavó agregando 5 ml de PBS 1X, se agitó mediante vórtex y se centrifugó nuevamente. Se repitió el lavado anterior una vez más y finalmente la proteína fue resuspendida en 1 ml de PBS 1X con una micropipeta y mediante vórtex. Se tomó una muestra de la proteína recuperada para su cuantificación y el resto fue almacenado a -80 ^{o}C.

VI.2.2.9 Cuantificación por el método del ácido bicinconínico (BCA)

La concentración total de la neurohormona CHH-B1$_{His}$ fue determinada por medio del método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando el kit BCA Protein Assay (PIERCE). El método se basa en la reacción de reducción del ion Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en medio alcalino y su detección colorimétrica por medio del ácido bicinconínico. El producto de la reacción formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso se observa de color morado. El complejo soluble en agua presenta una absorbancia a 562 nm.

Para llevar a cabo la cuantificación se realizó una curva estándar con diluciones de albumina de suero bovino (BSA) (PIERCE).

El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos (anexo A.8). Cada estándar y la muestra de CHH-B1$_{HIS}$ fueron analizados por triplicado. Para la lectura de la absorbancia a 562 nm de las muestras se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop NanoVue (GE Healthcare). Como blanco se utilizó PBS 1X. La construcción de la curva estándar se realizó graficando los valores promedio de la absorbancia a 562 nm de los estándares contra su concentración utilizando el software Office Excel (Microsoft). A partir de esa curva estándar se determinó la concentración de CHH-B1$_{His}$ interpolando el valor de absorbancia obtenido para la muestra.

VI.3 Efecto de la dopamina y de la neurohormona CHH-B1 en los niveles de respuestas fisiológicas en la hemolinfa de camarones juveniles *L. vannamei*

VI.3.1 Crecimiento y mantenimiento de organismos

Se recibieron 10,000 postlarvas de *L. vannamei* (PL_{18}) provenientes de la granja acuacultura Mahr (La Paz, B.C.S), las cuales fueron distribuidas en estanques de 2000 l y mantenidas hasta obtener organismos sub-adultos. Las condiciones a las cuales se mantuvieron fueron 28 ± 1 °C de temperatura mediante un calentador de 1000 W, 35 ± 1‰ de salinidad, 5.8 ± 0.5 mg/l de oxígeno disuelto mediante aireación constante, fotoperiodo natural, un recambio diario de agua al 100%. Los camarones se alimentaron diariamente con dieta comercial equivalente al 5% de su peso distribuido en tres raciones diarias. Los restos de alimento y las heces fueron removidos del fondo del estanque diariamente mediante sifoneo.

VI.3.2 Bioensayos

VI.3.2.1 Condiciones experimentales

Para llevar a cabo los bioensayos se seleccionaron aleatoriamente 162 camarones sub-adultos con un intervalo de peso de 12-16 g. Los organismos seleccionados fueron colocados individualmente en cubetas de 3.5 l de capacidad con la finalidad de llevar a cabo el seguimiento individualizado del ciclo de muda de cada organismo. Las cubetas donde se colocaron los organismos fueron distribuidas en 8 estanques circulares de 200 l, conteniendo cada uno aproximadamente 25 cubetas. Las condiciones experimentales: 26 ± 1 °C de temperatura la cual se mantuvo mediante un calentador de titanio de 1000 W, una salinidad de 35 ± 1 ‰ (condición hiper-osmótica). El agua fue suministrada por el sistema de agua de mar del CICESE, se mantuvo aireación constante para mantener el oxígeno disuelto a 5.8 ± 0.5 mg/l de, fotoperiodo natural y recambio diario de agua al 100%. Los camarones se alimentaron diariamente con Aquaprofile 35 (Purina) distribuido en dos raciones diarias (9 am y 5 pm) correspondientes en total al 5%

de su peso. Los restos de alimento y las heces fueron removidos de las cubetas diariamente mediante sifoneo.

Los animales se aclimataron durante 7 días bajo estas condiciones antes de iniciar el seguimiento del ciclo de muda, por lo que se requirió llevar un registro detallado para dar seguimiento a los eventos de exuviación de cada animal. Con base a la duración del ciclo de muda de cada organismo se estableció realizar los ensayos experimentales en la mitad del tiempo comprendido entre dos eventos de exuviación consecutivos (intermuda, estadio C). Esto se hizo con la finalidad de homogenizar las mediciones en las variables fisiológicas, ya que en este estadio los organismos cuentan con una mayor estabilidad metabólica y osmótica. Para todos los casos los organismos se mantuvieron en ayuno durante 24 horas antes de la extracción de hemolinfa.

VI.3.2.2 Control experimental general

Se utilizaron un total de 12 organismos como control experimental general. A estos organismos no se les aplicó ningún tratamiento ya que solamente se siguió su ciclo de muda y una vez que mudaron dos veces, a la mitad del siguiente ciclo de muda (intermuda) se les extrajeron 70 µl de hemolinfa con una jeringa hipodérmica estéril 27 G a partir del primer segmento abdominal, la cual fue mezclada inmediatamente con 2 volúmenes de solución anticoagulante SIC-EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA.Na_2 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/kg) (Vargas-Albores *et al*., 1993) y posteriormente fueron centrifugadas.

VI.3.2.3 Inyección con solución salina

Con la finalidad de tener valores de referenciales del estrés ocasionado por la manipulación e inyección en los camarones, a un total de 50 organismos en intermuda se les inyectó 50 µl de solución salina estéril (NaCl 0.85%) a través de la membrana artrodial del quinto par de pereiópodos con una jeringa hipodérmica estéril (27 G).

VI.3.2.4 Inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$

Un total de 50 organismos en intermuda fueron inyectados con 2 µg de CHH-B1$_{His}$ disuelta en 50 µl PBS 1X.

VI.3.2.5 Inyección con dopamina

Se inyectaron 50 organismos en intermuda con 50 µl de solución de hidrocloruro de dopamina (Sigma-Aldrich) preparada con solución salina estéril a una concentración de $2x10^{-2}$ mol/l para alcanzar dosis internas de 10^{-6} mol/camarón.

VI.3.2.6 Obtención de muestras de hemolinfa

En el caso de los camarones tratados con solución salina, CHH-B1$_{His}$ o dopamina la extracción de hemolinfa se realizó a las 0.5, 1, 2, 4 y 24 h posteriores a la inyección de cada organismo. Las muestras de hemolinfa para cada tiempo, se obtuvieron a partir de 10 organismos diferentes. De cada organismo se obtuvo un volumen aproximado de 100 µl con una jeringa hipodérmica estéril 27 G a partir de la parte dorsal del primer segmento abdominal. De este volumen se destinaron 10 µl para determinar la concentración de oxihemocianina, 10 µl para medir la osmolaridad.

Del volumen restante de hemolinfa, se tomaron 70 µl y se mezclaron inmediatamente con solución anticoagulante SIC-EDTA en proporción 2:1 con la cantidad de hemolinfa para llevar a cabo la obtención de plasma sanguíneo.

VI.3.3 Determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa

VI.3.3.1 Presión osmótica y capacidad osmorreguladora

La osmolaridad se determinó mediante la medición de la presión osmótica a partir de 10 µl de hemolinfa fresca en un osmómetro de vapor (Wescor 5200), el cual fue calibrado con estándares de 100, 200 y 1000 mOsmol/kg (OPTI-MOLE, Wescor). Adicionalmente se midió la presión osmótica del agua de mar de cada uno de los estanques (medio externo) por triplicado y se consideró el promedio de todos. Los

valores se expresaron en mOsmol/kg. La capacidad osmorreguladora se calculó como la diferencia entre la osmolaridad de la hemolinfa y la osmolaridad del medio externo (Lignot *et al*., 2000).

VI.3.3.2 Oxihemocianina

Se diluyeron 10 µl de hemolinfa recién obtenida con 990 µl de agua destilada en una cubeta espectrofotométrica de cuarzo de 1cm^3 y se leyó la absorbancia a 335 nm con espectrofotómetro con lámpara de luz UV (Hach). La concentración de oxihemocianina de cada muestra se calculó mediante la siguiente ecuación (Hagerman, 1983).

$$Hc = \left(\frac{Abs_{335nm}}{E}\right)(FD)$$

Donde, Hc es la concentración de oxihemocianina en la hemolinfa, Abs_{335nm} es el valor de absorbancia a 335 nm obtenido para la muestra, $E = 17.26$ determinado en base a una subunidad mínima funcional de 74,000 kDa de la hemocianina de crustáceos (Hagerman, 1983), FD es el factor de dilución. Los valores de concentración fueron expresados en mmol/l.

VI.3.3.3 Análisis de analitos plasmáticos

VI.3.3.3.1 Obtención de plasma sanguíneo

La hemolinfa mezclada con solución anticoagulante fue centrifugada a 3000 rpm a 4 °C durante 5 min para separar el plasma sanguíneo del componente celular de la hemolinfa. El plasma se recuperó y se separó en alícuotas de 45 µl para llevar a cabo las mediciones de los metabolitos: glucosa, triglicéridos y proteínas totales.

VI.3.3.3.2 Proteínas totales

Para la cuantificación de la concentración de proteínas se utilizó el kit Protein assay (BIO-RAD), el cual está basado en el método de Bradford (1976) y se

siguieron las recomendaciones del proveedor. En este método el colorante azul de Coomassie cambia de color en respuesta a la concentración de proteína en la muestra, teniendo el complejo una absorbancia máxima de 595 nm. El colorante se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos analizando cada muestra por triplicado con un lector de microplacas marca Beckman Coulter AD200 a una absorbancia de 595 nm. La concentración de proteínas se determinó a partir de una curva con estándares de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.5 mg/ml de BSA (anexo A.9).

VI.3.3.3.3 Relación oxihemocianina/proteínas totales

La relación oxihemocianina/proteínas totales para cada organismo se calculó dividiendo la concentración de oxihemocianina (mmol/l) entre la concentración de proteínas totales y fue transformada de mg/ml a mmol/l dividiendo entre 66 (Chen y Cheng, 1993). El resultado obtenido de la transformación, a su vez fue expresado de manera porcentual.

VI.3.3.3.4 Glucosa

Para determinar la concentración total de glucosa presente en la hemolinfa se utilizó el kit glucosa oxidasa (Pointe scientific). Este se basa en un método enzimático donde la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno reacciona con fenol y 4-amino fenazona por medio de una peroxidasa para producir el colorante quinoneimina el cual tiene una absorbancia a 500 nm, por lo tanto el valor de absorbancia obtenido es proporcional a la concentración de glucosa (Trinder, 1969).

Las muestras se analizaron por triplicado con un espectrofotómetro con lámpara de luz UV (BIO-RAD) y la concentración se calculó a partir de un estándar de glucosa con una concentración de 100 mg/dl (anexo A.10).

VI.3.3.3.5 Triglicéridos

La concentración de triglicéridos en la hemolinfa se cuantificó mediante el kit GPO (Pointe scientific), basado en la determinación enzimática del glicerol por la enzima glicerol fosfato oxidasa (por sus siglas en ingles, GPO) posterior a la hidrólisis por una lipasa. Los triglicéridos en el plasma son hidrolizados a glicerol por una lipasa, en presencia de ATP y la enzima glicerol cinasa. El glicerol es transformado en glicerol-1-fosfato, el cual es oxidado a glicerol por la GPO a peróxido de hidrógeno. La condensación del peróxido de hidrógeno con 4-clorofenol y 4-aminofenazona en presencia de una peroxidasa produce el colorante quinonimina que tiene una absorbancia cercana a 500 nm. La intensidad del complejo formado es proporcional a la concentración de triglicéridos (Fossati y Lorenzo, 1982).

Las muestras se analizaron por triplicado con un espectofotómetro lámpara de luz UV (BIO-RAD) y la concentración se calculó a partir de un estándar con una concentración de triglicéridos de 200 mg/dl (anexo A.11).

VI.3.3.4 Análisis estadísticos

Los datos de la presión osmótica, así como de la concentración de glucosa, triglicéridos, proteínas totales, oxihemocianina, y relación oxihemocianina/proteínas totales para cada tratamiento fueron graficados con respecto al tiempo mediante el software SigmaPlot (v. 10.0, Systat Software) en cajas verticales y bigotes, las cuales muestran los límites superior e inferior de la distribución (cuartiles); el tercer cuartil por debajo del cual están distribuidos el 75% de los datos; la mediana por encima y por debajo de la cual están el 50% de las observaciones; y el primer cuartil por debajo del cual se centran el 25% de los datos (Tukey, 1977). Así mismo se graficaron los intervalos de confianza al 95% para la distribución de los datos.

Los datos de capacidad osmorreguladora se graficaron mediante barras horizontales, mostrando la desviación estándar de los datos con respecto a la mediana.

Los datos para todas las respuestas fisiológicas (excepto la relación oxihemocianina/proteínas totales) se analizaron mediante la prueba no paramétrica de análisis de varianza de una vía en rangos de Kruskall-Wallis, debido a que en su mayoría no cumplieron con uno o ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se realizaron comparaciones de cada tiempo posterior a la inyección contra el grupo control sin inyectar con la prueba de Dunn (Zar, 1999).

Los resultados porcentuales de la relación oxihemocianina/proteínas totales se analizaron por medio de un análisis de regresión lineal simple con respecto al tiempo. En todos los análisis estadísticos el límite de aceptación y rechazo fue de $P<0.05$. Los datos se analizaron con el software SigmaStat (v.3.5, Systat Software).

VII. Resultados y Discusión

VII.1 Integración de la construcción pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de *Pichia pastoris*

VII.1.1 Aislamiento de ADN plásmídico

Como se puede observar en la electroforesis de la Fig. 7, el ADN del plásmido pPicZαA/CHH-B1 fue de buena calidad y libre de ADN genómico y de ARN.

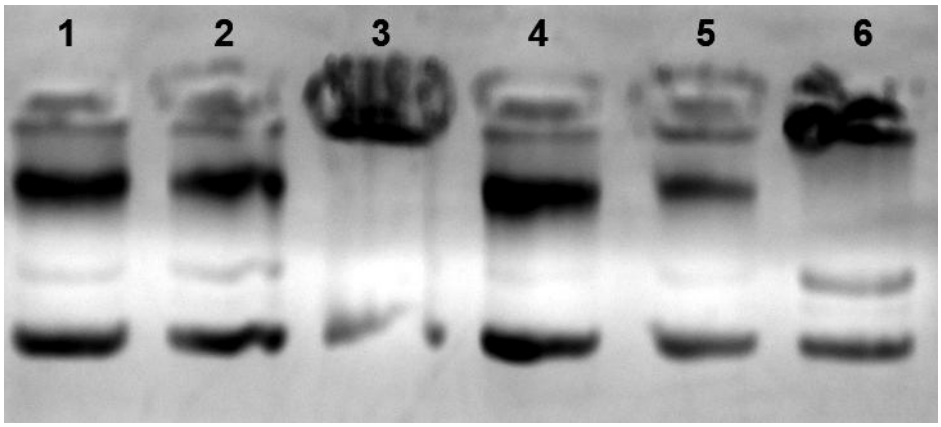

Figura 7. Extracciones de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* transformadas con el plásmido pPicZαA/CHH-B1. 1-6, muestras de ADN plasmídico.

Mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos α-factor y 3'AOX1 (Fig. 8) se corroboró la presencia del gen que codifica para la neurohormona CHH-B1 nativa en el ADN plasmídico al obtener productos del tamaño esperado (465 pb).

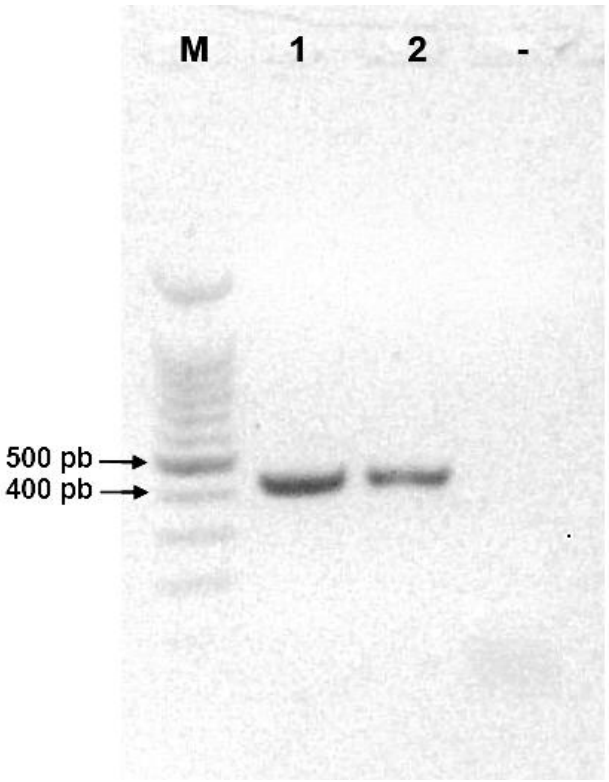

Figura 8. Productos de PCR a partir del plásmido pPicZαA/CHH-B1. M, marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Promega);1-2, amplificación de un fragmento de la construcción para CHH-B1; -, control negativo de la reacción .

Para linearizar el plásmido pPicZαA/CHH-B1 se realizó una amplificación por PCR. Esto se realizó con los oligonucleótidos PicFor y PicRev, los cuales fueron diseñados de tal manera que la base final del sitio de hibridación de uno fuera inmediatamente seguida por la base inicial del otro. Esto con el fin de evitar la pérdida de bases del promotor 5'*AOX1*, el cual contiene la secuencia que guía la recombinación con el locus *AOX1* del genoma de *P. pastoris* (López-Rodríguez, 2009). Se obtuvieron productos de 3,834 pb (Fig. 9) que corresponden con el tamaño esperado para la construcción. Estos productos se purificaron para llevar a cabo la transformación de *P. pastoris*.

Los productos de PCR del plásmido linearizado fueron purificados por el método de fenol congelado y su presencia y tamaño fueron corroborados en un gel de agarosa (Fig. 10)

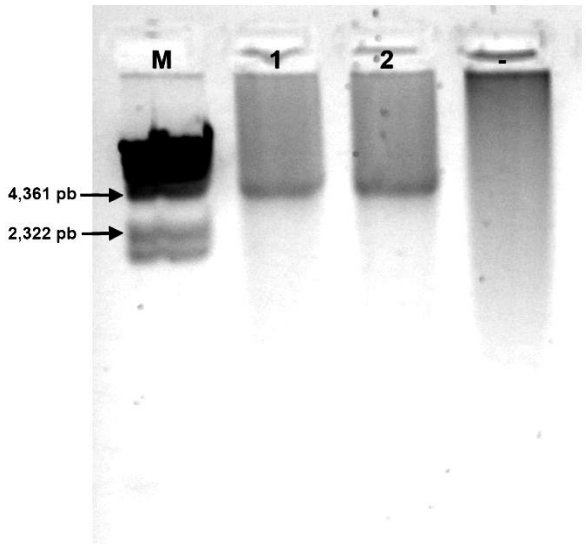

Figura 9. Amplificación del plásmido pPICZαA/CHH-B1. M, digestión fago lambda/*Hind*III; 1-2 producto de PCR correspondiente al plásmido pPicZαA/CHH-B1, control negativo de la reacción; carriles 3 y 4, plásmido pPICZαA/CHH-B1.

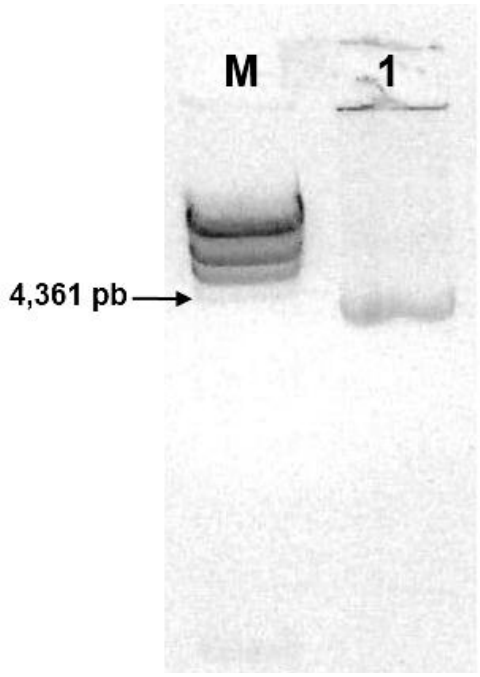

Figura 10. Producto de PCR purificado correspondiente al plásmido pPICZαA/CHH-B1. M, digestión fago λ con la enzima de restricción *Hind*III; 1, plásmido pPICZαA/CHH-B1.

VII.1.2 Transfección a *P. pastoris*

Después de la siembra de la cepa KM71 transfectada con el plásmido en placas de YPDS-agar con Zeocina, se obtuvieron más de 100 colonias resistentes a Zeocina, potenciales de contener la construcción que permite la expresión de CHH-B1 nativa en el genoma de *Pichia*. Se seleccionaron 42 colonias, y para confirmar la resistencia se resembraron en placas con YPD-agar con Zeocina. El análisis de los productos de PCR de las 10 colonias seleccionadas mostró la amplificación de fragmentos de 465 pb (Fig. 11), lo que indicó que todas ellas contenían la secuencia que permite la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa integrada en el genoma de *Pichia*.

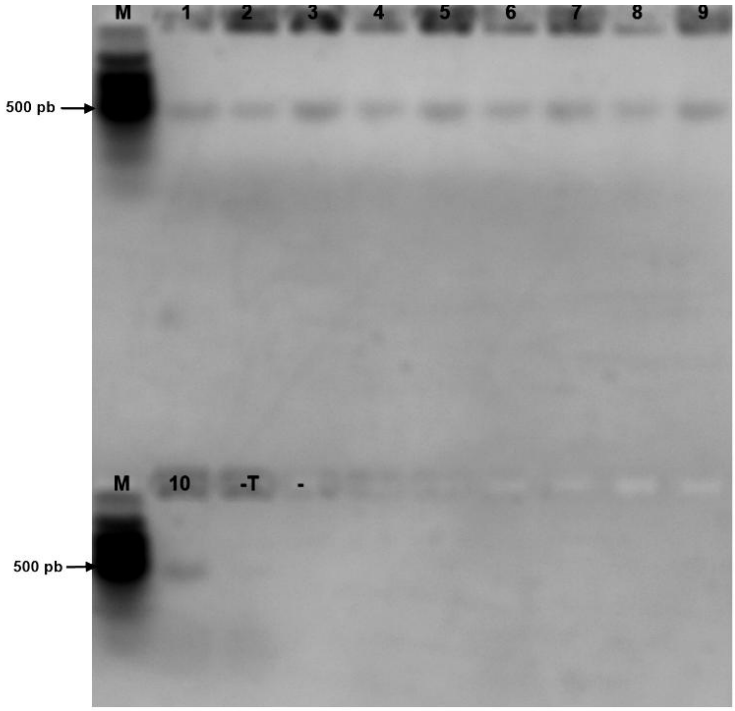

Figura 11. Amplificación por PCR a partir de de colonias de *Pichia* transformadas con el plásmido pPicZαA/CHH-B1 utilizando los oligonucleótidos α-factor y 3'AOX1. M, marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Promega); 1-10 y 12, amplificación de un fragmento del gen codificante de CHH-B1 nativa; -T, KM71 sin transformar; -, control negativo de la reacción.

La construcción sólo puede integrarse por medio de recombinación homologa simple con el locus *AOX1* del genoma de *P. pastoris*, dentro de la región 5' *AOX1* la cual es un promotor fuerte para la expresión de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1) (Cregg *et al*., 2000).

La secuencia de nucleótidos para la neurohormona CHH-B1 deducida a partir de un análisis de alineamiento múltiple en ambos sentidos a partir de las colonias enviadas a secuenciar con la neurohormona integrada en su genoma (Fig. 12) muestra que el péptido maduro se encuentra constituido por 73 aminoácidos, lo cual concuerda con el análisis previo de la secuencia para CHH-B1 realizado por Sánchez-Castrejón, (2007) donde el peso teórico esperado para la proteína fue de 9.1 kDa.

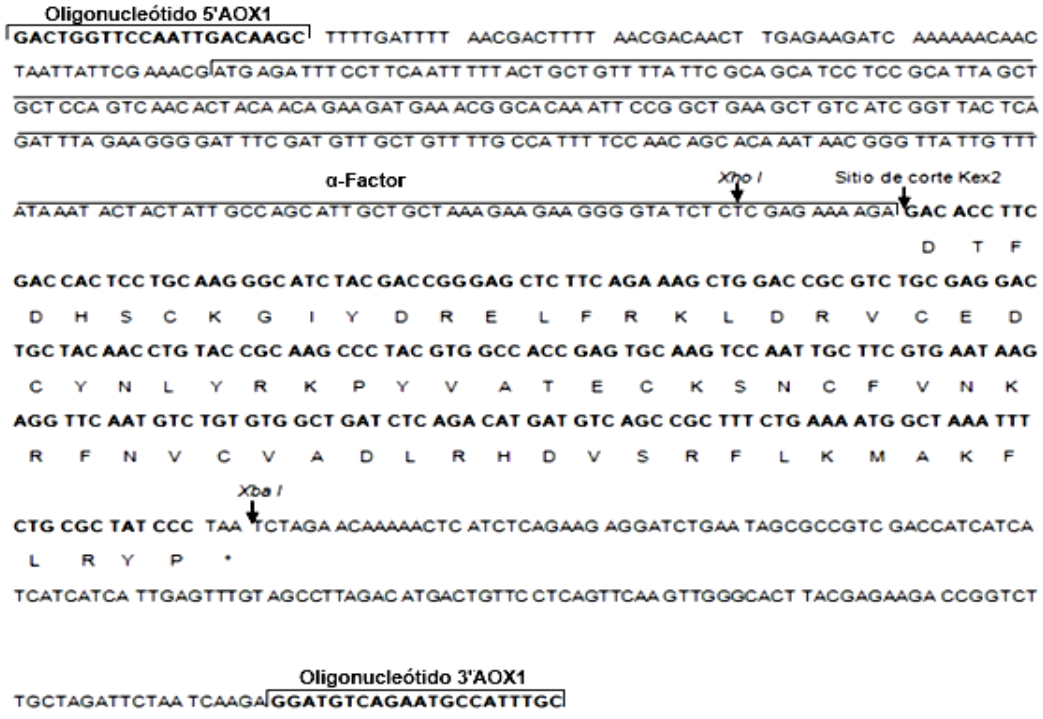

Figura 12. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida para CHH-B1. Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos usados para la secuenciación y los codones que codifican el péptido maduro se encuentran resaltados en negritas. Las flechas indican sitios de restricción y de proteólisis. El asterisco indica el codón de término.

VII.2 Expresión y purificación de las neurohormonas CHH-B1 nativa y CHH-B1 con un extremo C-terminal adicional

VII.2.1 Expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa en la levadura *Pichia pastoris*

VII.2.1.1 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa

Una vez comprobada la integración de la construcción en la cepa KM71, se realizó un ensayo de estandarización de las condiciones óptimas de expresión de la neurohormona. La inducción de la expresión de CHH-B1 a diferentes concentraciones de metanol (0, 1, 2 y 4%) con una duración de 5 días.

El análisis por electroforesis desnaturalizante en tricina mostró que no hubo expresión de CHH-B1 a concentraciones de metanol del 0 y 1% en ninguno de los días de inducción y solo se observó la presencia de proteínas de *Pichia* (Fig. 13a).

Entre los días 2-5 de inducción en el cultivo con 2% de metanol se obtuvieron fragmentos cuyo peso fue ligeramente menor a los 10 kDa (Fig. 13b), los cuales podrían ser la proteína recombinante CHH-B1 nativa ya que esta tiene un peso teórico de 9.1 kDa.

Al tercer día de inducción, se observó una banda del tamaño correspondiente a CHH-B1 nativa y una menor producción de otras proteínas contaminantes propias de *Pichia*. Por lo que determinamos que esa era la condición óptima para la expresión de la neurohormona CHH-B1 nativa.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Udomkit *et al* (2004) para la expresión de la neurohormonas heterólogas de *Penaeus monodon* Pem-CHH2 y Pem-CHH3 con la cepa KM71. Según sus resultados, encontraron que las condiciones óptimas para la expresión son 3% de metanol durante 2 días y en el caso de Pem-CHH2 y de 4% metanol por 2 días para Pem-CHH3.

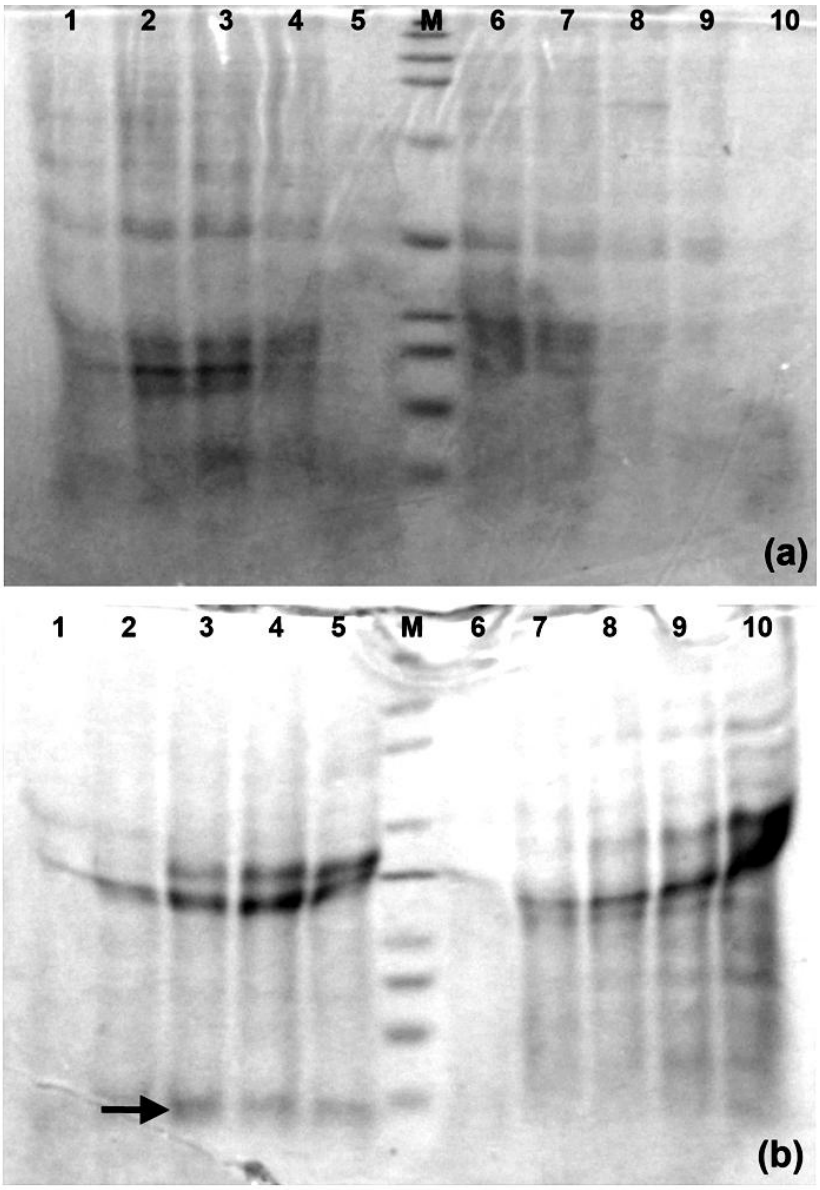

Figura 13. Análisis de los sobrenadantes de los cultivos de inducción de *P. pastoris* con 0, 1, 2 y 4% de metanol para la expresión de CHH-B1 mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 16.5% teñidos con azul de Coomassie. (a): 1-5, cultivo al 0% de metanol (días 1 al 5); 6-10, cultivo al 1% de metanol (días 1 al 5). (b): 1-5, cultivo al 2% de metanol (días 1 al 5); 6-10, cultivo al 4% de metanol (días 1 al 5). En a y b: M marcador de peso molecular Precision plus protein WesternC standars (BIO-RAD). La flecha indica la proteína de interés.

Sin embargo, los resultados son similares a los obtenidos en el ensayo de inducción para CHH-B1 realizado por Sánchez-Castrejón (2007) donde se expresó

la misma neurohormona pero en la cepa X-33, la cual presenta un fenotipo Mut^+. En esta cepa se obtuvo la expresión óptima de la neurohormona durante el día 2 al 2% de metanol.

La neurohormona nativa no fue utilizada en los ensayos de actividad porque su purificación requería de la aplicación de una metodología más compleja. Es por esto que se decidió proseguir con la metodología de expresión de la neurohormona CHH-B1 con extremo C-terminal adicional, ya que cuenta con la etiqueta 6xHis que permite su purificación fácil y rápida por cromatografía de afinidad.

VII.2.2 Expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$ en la levadura *Pichia pastoris*

VII.2.2.1 PCR de colonia

Para verificar la presencia de la construcción de la neurohormona CHH-B1 con un C-terminal adicional (CHH-B1$_{His}$) en el genoma de la cepa KM71/CHH-B1$_{His}$, se realizó un análisis por PCR a seis colonias elegidas aleatoriamente obtenidas de cultivos criopreservados. En la figura 14, se muestran el resultado del análisis, donde en todos los casos se obtuvo un resultado positivo, representado por un producto de 465 pb.

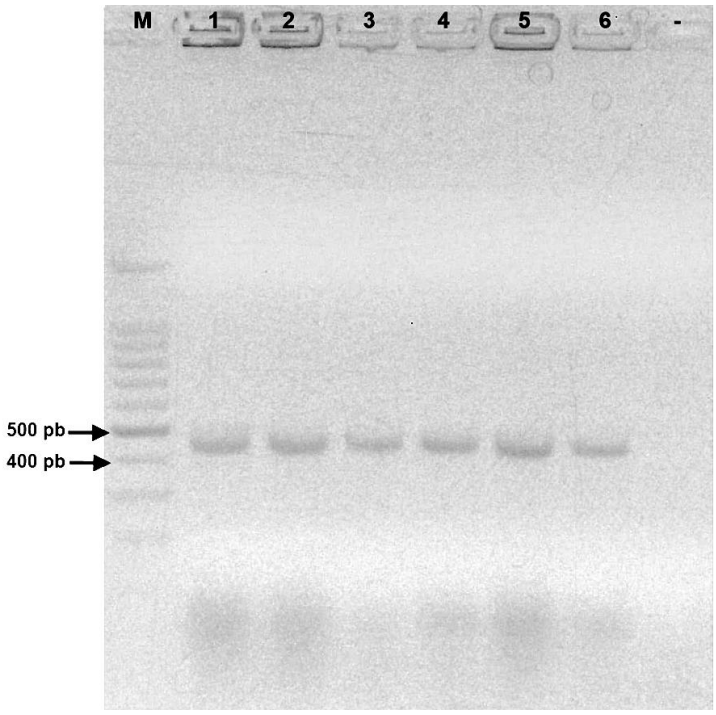

Figura 14. Amplificación de un fragmento de la construcción pPICZαA/CHH-B1$_{His}$, a partir de colonias de la cepa KM71/CHH-B1$_{His}$. M, marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Promega); 1-6, amplificación de CHH-B1$_{His}$; -, control negativo de la reacción.

VII.2.2.2 Inducción de la expresión de la neurohormona CHH-B1$_{His}$

Al igual que hizo con la nativa, con la CHH-B1$_{His}$ también una vez corroborada la presencia de la construcción en la cepa seleccionada, se llevó a cabo un ensayo de inducción de la expresión de la neurohormona con diferentes concentraciones de metanol (0, 1, 2 y 4%) durante 5 días para determinar las condiciones óptimas de producción.

Según el análisis por medio de electroforesis desnaturalizante en tricina de las proteínas precipitadas a partir de los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris*, no se obtuvo expresión de CHH-B1$_{His}$ a concentraciones de metanol del 0 y 1% en ninguno de los días de inducción (Fig. 15a).

Por otra parte, en los cultivos con 2 y 4% de metanol, en ambos se obtuvieron bandas alrededor de los 15 kDa en los días 1 y 2 de inducción (Fig. 15b), que parecen corresponder a la proteína recombinante CHH-B1$_{His}$. Según lo

reportado por Sánchez-Castrejón (2007), aunque el tamaño teórico de la proteína es de 12.1 kDa, la banda visible en un gel de poliacrilamida al 16.5 % aparenta un tamaño alrededor de 15 kDa.

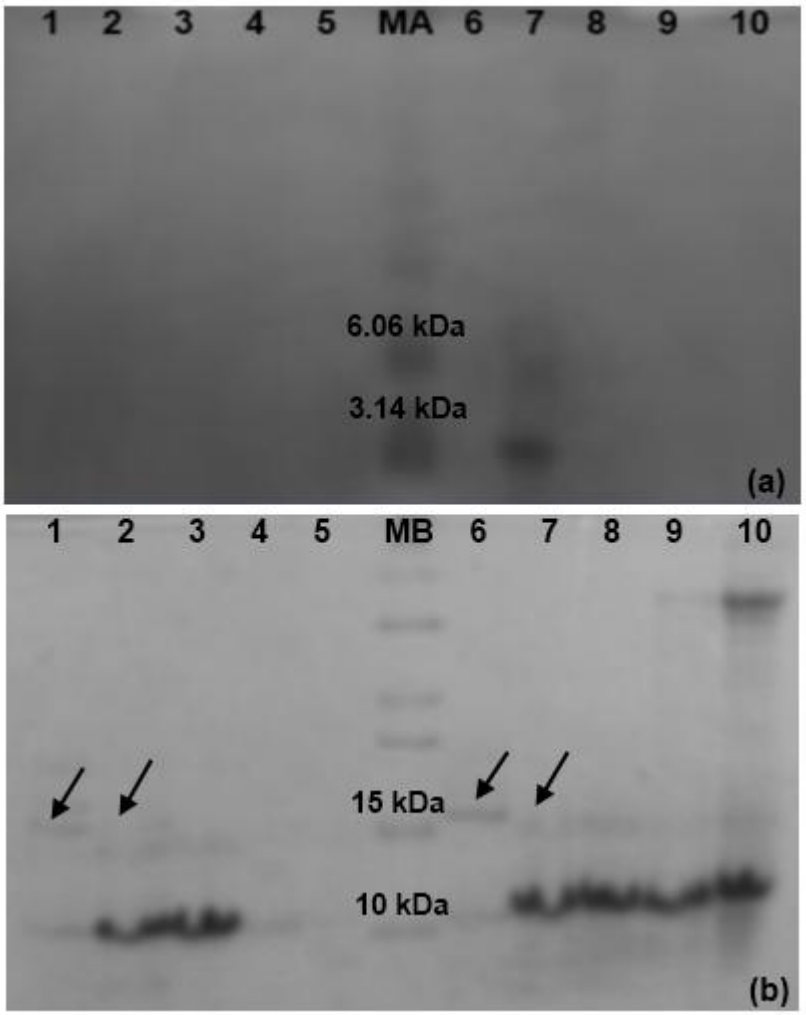

Figura 15. Análisis de los sobrenadantes de los cultivos de inducción de *P. pastoris* con 0, 1, 2 y 4% de metanol para la expresión de CHH-B1$_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 16.5% teñidos con azul de Coomassie. (a): 1-5, cultivo al 0% de metanol (días 1 al 5); MA, marcador de peso molecular Prestained protein molecular weight standars (GIBCO); 6-10, cultivo al 1% de metanol (días 1 al 5). (b): 1-5, cultivo al 2% de metanol (días 1 al 5); MB, Precision plus protein WesternC standars (BIO-RAD); 6-10, cultivo al 4% de metanol (días 1 al 5). Las flechas indican las proteínas de interés.

De acuerdo a lo observado en la electroforesis la mayor expresión de la proteína recombinante se obtuvo a una concentración de 4% de metanol a las 24 h de inducción.

Lo anterior fue confirmado por el análisis de Western blot con el anticuerpo anti-*myc*-HRP (Invitrogen) (Fig. 16). También se pudo confirmar que la banda de alrededor de 15 kDa es la que correspondió a CHH-B1$_{His}$. Sin embargo, también son detectadas las bandas de peso molecular superior a 15 kDa.

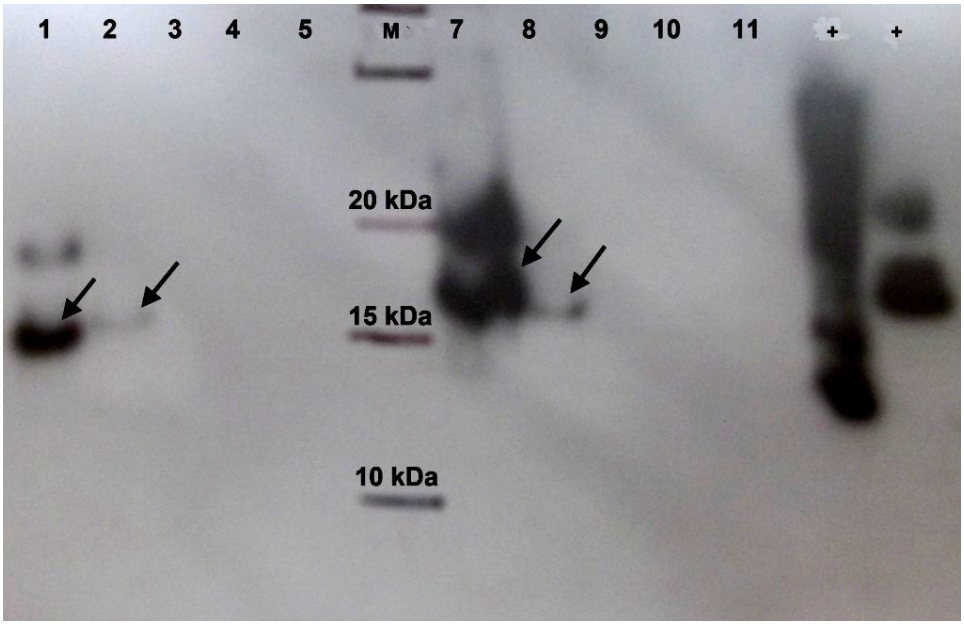

Figura 16. Inmunodetección por western blot de CHH-B1$_{His}$ con anti-*c-myc*-HRP (Invitrogen) en los cultivos de inducción de *P. pastoris* al 2 y 4% de metanol. 1-5, cultivo al 2% de metanol (días 1 al 5); M, marcador de peso molecular Precision plus protein WesternC standars (BIO-RAD); 7-11, cultivo al 4% de metanol (días 1 al 5); +, control positivo del Western blot. Las flechas indican las proteínas de interés.

Estas bandas que no superan los 23 kDa anteriormente fueron observadas y analizadas por secuenciación del N-terminal por Sánchez-Castrejón (2007) determinándose que se trata de diferentes conformaciones de CHH-B1$_{His}$. En este

ensayo las condiciones óptimas de expresión coinciden con las reportadas por Sánchez-Castrejón *et al* (2008) y Mancera-Flores (2009). Lo anterior también fue observado para la neurohormona recombinante CHH-B2EK expresada también en la cepa KM71 (López-Rodríguez, 2009).

VII.2.2.3 Escalamiento del cultivo

Al analizar el sobrenadante obtenido de los escalamientos por Tricina-SDS-PAGE (Fig. 17) se obtuvieron bandas que correspondieron a la neurohormona CHH-$B1_{His,}$ por lo cual se decidió proceder a su purificación por cromatografía de afinidad.

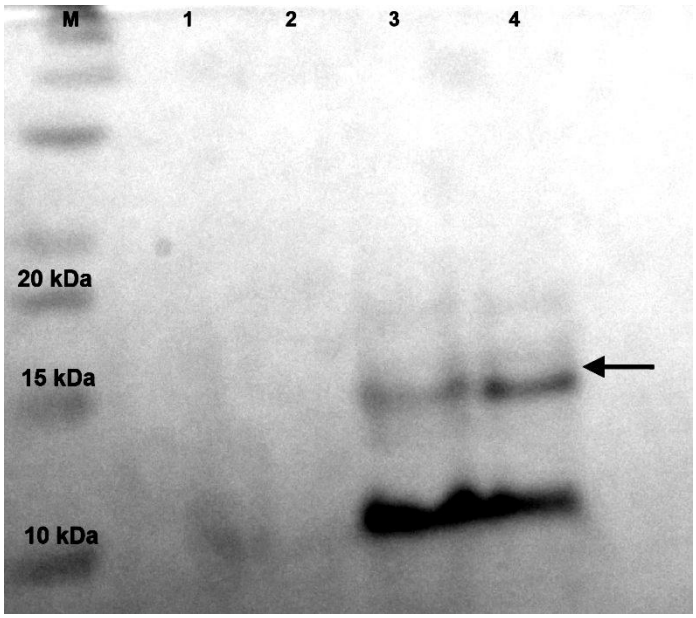

Figura 17. Análisis de la cosecha de los cultivos de *P. pastoris* procedentes del escalamiento para la producción de neurohormona CHH-$B1_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 16.5% teñido con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular Precision plus protein WesternC standars (BIO-RAD); 1-2, cultivos antes de la inducción; 3-4, cultivos con 4% de metanol al momento de la cosecha. La flecha indica la proteína de interés.

VII.2.2.4 Purificación por cromatografía de afinidad

A partir de un total de 200 ml de sobrenadante de cultivo obtenido de los escalamientos, se llevó a cabo la purificación de CHH-B1$_{His}$ mediante cromatografía de afinidad en una columna cargada con resina de níquel, por la cual tienen afinidad la etiqueta 6xHis en el C-terminal de la proteína. Este procedimiento permitió obtenerla de manera concentrada y libre de otras proteínas. El análisis por Tricina-SDS-PAGE de las fracciones eluídas (Fig. 18) mostró la remoción total de las proteínas contaminantes, obteniéndose solamente la neurohormona recombinante principalmente en las dos primeras fracciones.

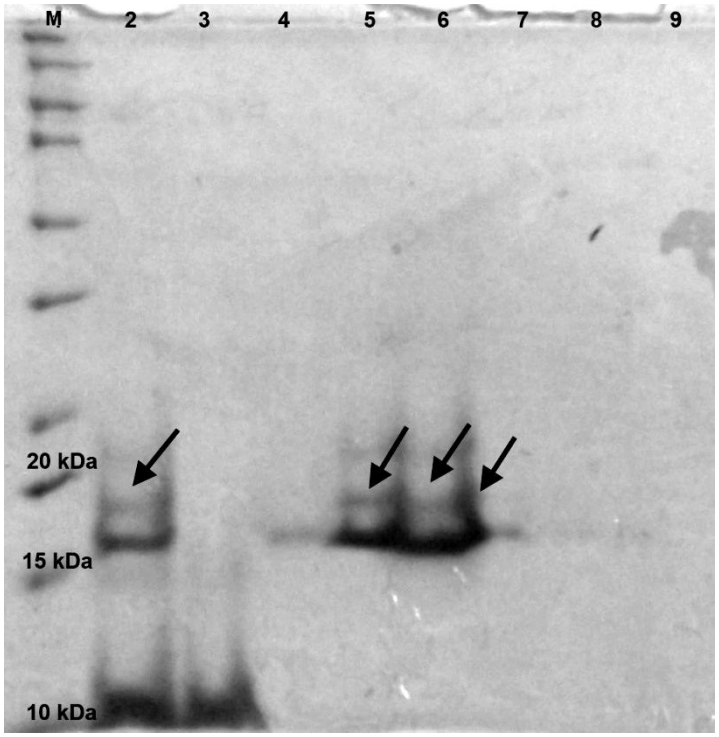

Figura 18. Análisis de la purificación de CHH-B1$_{His}$ mediante electroforesis (Tricina SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 16.5% teñido con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular Precision plus protein WesternC standars (BIO-RAD); 2, muestra antes de ser pasada por la columna; 3, muestra después de pasar por la columna; 4, lavados, 5-9, fracciones eluídas de la columna.

Al cuantificar la proteína purificada a partir de la curva estándar de BSA (Fig. 19) se obtuvo una concentración de 736.5 µg/ml. De acuerdo con estos resultados se puede estimar un rendimiento de aproximadamente 5.72 mg/L en nuestras manos, que fue menor al reportado por Sánchez-Castrejón (2007) para la producción de CHH-$B1_{His}$ quien obtuvo un rendimiento de 8.7 mg/L. Igualmente con lo reportado por Treerattrakol *et al* (2002) para el péptido recombinante de *Penaeus monodon* Pem-CMG expresado en la cepa KM71 con dos constructos distintos αCMG y α2EACMG, quienes obtuvieron rendimientos de 150 mg/L y 60 mg/L respectivamente.

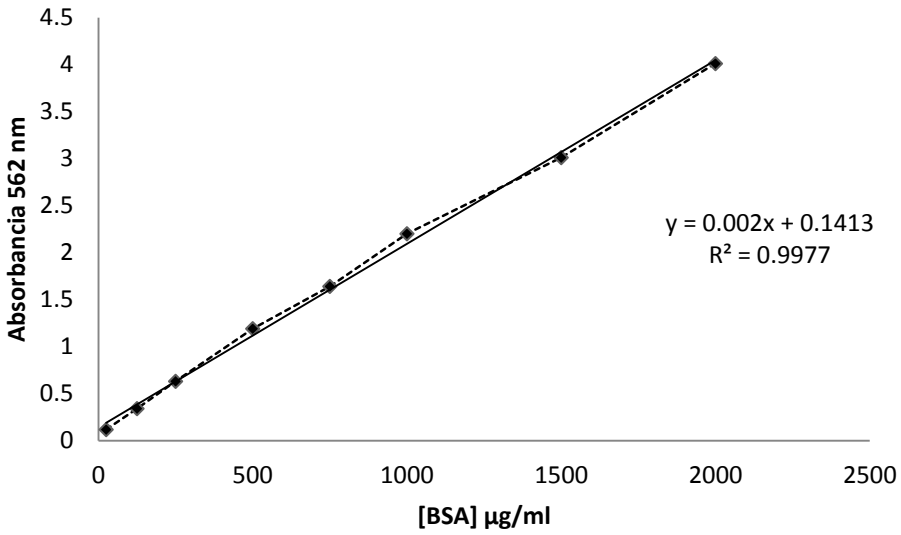

Figura 19. Regresión lineal para los valores de absorbancia y las concentraciones conocidas de BSA. En el eje de las x se muestran las concentraciones conocidas de BSA y en el eje de las y los valores obtenidos de absorbancia a 562 nm para esas concentraciones de BSA.

Sin embargo, el rendimiento obtenido para CHH-$B1_{His}$ es mayor al reportado por Udomkit *et al* (2004) para las neurohormonas Pem-CHH2 y Pem-CHH3 de *P. monodon* donde se obtuvieron rendimientos de 0.270 mg/L y 0.450 mg/L respectivamente.

Aunque en todos estos casos citados se utilizó la misma cepa y cultivos en matraz con agitación, las diferencias en cuanto a los rendimientos obtenidos quizás se debieron a la dificultad que representa el control de las condiciones ambientales en este tipo de cultivos (oxígeno disuelto y temperatura). Con respecto al oxígeno disuelto, este es limitante en el metabolismo del metanol y por lo tanto afecta la cantidad de proteína recombinante expresada, es por esto que el rendimiento puede ser influenciado por ejemplo, por el diseño del matraz, la velocidad de agitación y la densidad celular, factores que afectan el suministro y disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo (Villatte *et al*., 2001; Larentis *et al*., 2004).

VII.3. Bioensayos

VII.3.1 Determinación de las respuestas fisiológicas en la hemolinfa

Los resultados presentados a continuación corresponden a las mediciones de las respuestas fisiológicas en *L. vannamei* tratados con solución salina, la neurohormona CHH-$B1_{His}$ o dopamina con respecto al tiempo.

En cada punto de medición se consideró para los análisis estadísticos un intervalo de 7-10 datos individuales (n=7-10). Las contrastaciones de las respuestas cuantificadas en todos los tiempos posteriores a la aplicación de un tratamiento se hicieron contra el grupo control (sin inyectar). Además, cuando se hace referencia a valores “máximos o mínimos”, se refieren a valores de la mediana “máximos o mínimos” de cada tratamiento.

VII.3.1.1 Glucosa

Los camarones inyectados con solución salina (Fig. 20), mostraron un aumento no significativo en los niveles de glucosa (28.569 mg/dl) a las 0.5 h posterior a la inyección. Esto comparado con el grupo control (23.910 mg/dl) y en general, mostró una tendencia decreciente de los niveles de glucosa, obteniéndose una disminución significativa a las 2 y 24 h post-inyección. Es importante mencionar

que se obtuvieron valores por debajo del control a las 24 h siendo estos de18.149 mg/dl.

Nuestros resultados son de un valor basal más alto que el reportado por Racotta y Palacios (1998) en organismos juveniles de 6-8 g, así como con respecto al encontrado por Sánchez-Campos (2010) en organismos adultos (23-32 g) mantenidos a 26 ^{o}C y 35 ‰. En ambos casos el valor basal de glucosa fue de 10 mg/dl. Sin embargo, fue similar al reportado por Galindo *et al*. (2009) de 0.25 mg/ml (25 mg/dl) en juveniles de 8-12 g aclimatados a 29 °C y 36 ‰.

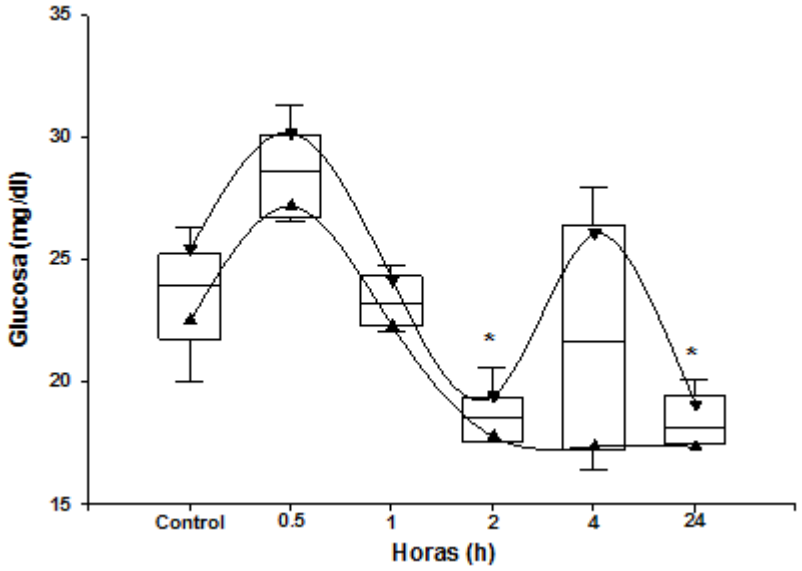

Figura 20. Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

Es posible que el ligero incremento de la glucosa del tratamiento salino pudiera haber sido consecuencia del estrés por la manipulación de los camarones. La hiperglucemia ha sido documentada como una respuesta típica en decápodos a los cambios ambientales, físicos y químicos, por lo cual constituye un marcador bastante sensible de estrés (Webster, 1996; Chang *et al*., 1998; Chang., 2005;

Lorenzon *et al*., 2004; Lorenzon, 2005; Pérez-Jar *et al*., 2006; Chung y Zmora, 2008). Racotta y Palacios (1998) reportaron que la manipulación experimental y el muestreo repetitivo de hemolinfa en organismos juveniles de *L. vannamei* ocasionó un aumento significativo de los niveles de glucosa al inyectarlos con solución salina.

En este trabajo los muestreos no fueron repetitivos lo cual evitó que se causara un estrés agudo permitiendo su recuperación de la condición de hiperglucemia. El mismo patrón fue observado por Wanlem *et al*. (2011) a lo largo del experimento, tras administrar solución salina y muestrear camarones diferentes de *L. vannamei.*

El nivel de glucosa de los organismos inyectados con CHH-$B1_{His}$ (Fig. 21) aumentó a las 0.5 h post-inyección, alcanzando un valor máximo y significativamente mayor al control (35.6124 mg/dl) tras 1 h post-tratamiento para posteriormente descender hasta concentraciones cercanas al basal a las 24 h.

El aumento significativo de glucosa a 1 h post-inyección demostró que CHH-$B1_{His}$ presentó actividad hiperglucémica, confirmando lo propuesto por Sánchez-Castrejón *et al*. (2008), quienes inyectaron 2 µg de la proteína heteróloga en individuos ablacionados unilateralmente obteniéndose una elevación significativa con respecto al control (12.9 mg/dl a 1 h post-inyección). Las diferencias encontradas en el presente trabajo con respecto al de Sánchez-Castrejón *et al* (2008) pudieron deberse a la falta de ablación unilateral en los organismos, por lo cual la neurohormona recombinante pudo haber tenido un efecto aditivo a los niveles naturalmente secretados de otras isoformas de CHH.

El patrón que observamos en este trabajo también fue similar al reportado por Wanlem *et al*. (2010) posterior a la inyección de 25 µg/camarón de la neurohormona rLv-CHH en *L. vannamei* no ablacionados. Señalando, un aumento significativo sobre el control con PBS, a partir de las 0.5 h y una fuerte hiperglucemia tras 1 h post-inyección.

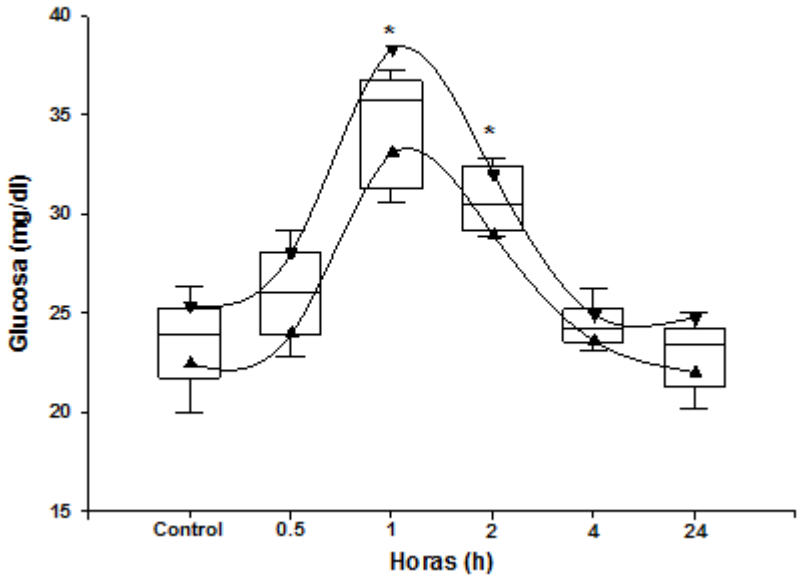

Figura 21. Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

Los niveles altos de glucosa en la hemolinfa de crustáceos mediada por CHH tiene la finalidad de proveer combustible a las células para hacer frente a las demandas energéticas del momento. Como ya se ha mencionado anteriormente es parte de los mecanismos adaptativos al estrés y un proceso sujeto a control homeostático (Fanjul, 2006).

Por otra parte, el extremo C-terminal adicional de la proteína recombinante compuesto por 22 residuos de aminoácidos pudo haber limitado su función hiperglucémica. Para las CHH's se hipotetiza que la actividad hiperglucémica está contenida en el C-terminal gracias a la amidación del péptido maduro en esta región. Katayama *et al*. (2002) y Mosco *et al*. (2008) recalcan la importancia de la amidación en las CHH's recombinantes de *Penaeus japonicus* y *Astacus leptodactylus* respectivamente, siendo las neurohormonas amidadas las que presentan mayor actividad hiperglucémica sobre las no amidadas. Sin embargo,

con base a los análisis de la secuencia de CHH-B1, esta neurohormona no parece ser amidada en forma natural, debido a que no presenta los aminoácidos GK en la región C-terminal a diferencia de CHH-A y CHH-B2 (Lago-Lestón, 2007). La obtención de CHH-B1 en su forma nativa, así como el estudio de su estructura y ensayos de actividad posteriores permitirían conocer la actividad hiperglucémica real, así como dilucidar si lleva a cabo funciones adicionales que se asocian a las CHH's como la muda y la osmoregulación (Chang *et al*., 1990; Serrano *et al*., 2003).

Lago-Lestón *et al*. (2007), demostraron que diferentes temperaturas y salinidades modifican el patrón de expresión relativa del gen que codifica a CHH-B1. Su expresión fue mayor a temperaturas bajas (20 °C) y salinidades relativamente bajas (16 ‰), y a temperaturas altas (32 °C) y salinidades altas (40 ‰). Esto, destaca la importancia del estudio de esta neurohormona en condiciones de estrés y su posible papel en osmoregulación.

En los ensayos llevados a cabo con dopamina (Fig. 22) y después de 0.5 h de la inyección, observamos un aumento en los valores de glucosa en relación al grupo control. Los valores significativamente más altos fueron a 1 h post-inyección (38.936 mg/dl) en un 63% con respecto al control, un 68% mayor a lo obtenido en solución salina, y un 9% superior a lo obtenido en CHH para el mismo tiempo. Estos valores descendieron a las 2 h hasta llegar a niveles similares a los basales a partir de las 4 h.

En crustáceos, la dopamina y otras aminas biogénicas como por ejemplo, la serotonina, encefalinas, noraepinefrina y octopamina han sido relacionadas con la hiperglucemia (Lee *et al*., 2001; Lorenzon *et al*., 2005; Yeh *et al*., 2006; Chiu *et al*., 2007; Chang *et al*., 2007).

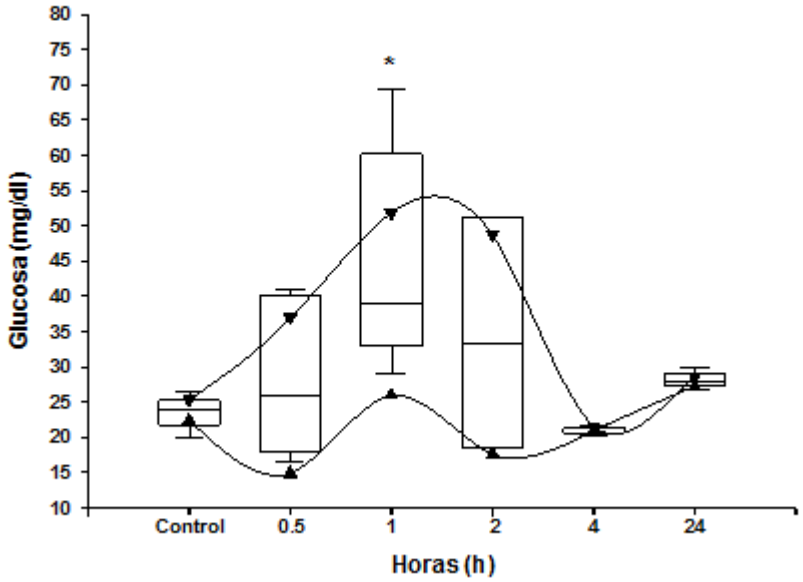

Figura 22. Concentración de glucosa obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

En el caso de la dopamina, estudios realizados en peneidos enfatizan su efecto hiperglucémico. En *P. monodon* se ha encontrado que la inyección de dopamina ocasiono un aumento significativo en los niveles de glucosa a las 2 h a una dosis de 10^{-7} moles/camarón y 10^{-8} moles/camarón, siendo el efecto mayor a menor dosis (Chang *et al*., 2007).

Recordando el circuito de regulación de la secreción de CHH, las aminas biogénicas funcionan como una señal para su secreción y liberación, pero también el lactato producido vía glucólisis puede servir como una señal mediante retroalimentación positiva. Por otra parte, la hormona estimula la glucogenólisis incrementando la disponibilidad de glucosa, y el exceso de la misma puede inhibir la liberación de la hormona mediante retroalimentación negativa (Fanjul, 2006). Al

haber una recuperación más pronta de los niveles basales de lactato es muy posible que la dopamina tenga un efecto hiperglucémico vía CHH.

Los resultados obtenidos a una concentración de 10^{-6} moles/camarón refleja un perfil dosis-respuesta similar a los encontrados en *L. vannamei*, por Chiu y colaboradores (2006) al inyectar dopamina a concentraciones de 10^{-8}, 10^{-7} y 10^{-6} moles/camarón donde observaron un aumento significativo de los niveles de glucosa a partir de las 2 h y una baja en los niveles a partir de las 4 h, siendo mayor el efecto a la misma dosis aplicada en nuestro estudio. Ellos hipotetizaron que el efecto producido por la dopamina pudo estar mediado por CHH, basándose en los niveles de lactato obtenidos, los cuales alcanzaron valores basales a las 4-8 h a diferencia de la que los obtuvieron a 8-24 h post-inyección. Pero, no pueden descartar que la elevación de la glucosa se haya debido a estrés por la inyección.

Aparicio-Simón *et al*. (2010) reportaron que el efecto de la manipulación en *L. vannamei* produjo un aumento significativo en los niveles de dopamina en el pedúnculo ocular a los 30 min y de glucosa a los 60 min. Esto, sumado a un aumento previo de la concentración de lactato en la hemolinfa reportado, sugirió que tanto la dopamina como el lactato actuaron conjuntamente como señales para la liberación de la hormona.

Por otra parte, en *Procambarus clarkii* se ha observado que la inyección con dopamina aumentó los niveles de glucosa y CHH después de 1 h, mientras que en organismos ablacionados no hubo respuesta hiperglucémica (Zou *et al*., 2003). Por otra parte, en *Palaemon elegans*, la cuantificación de los niveles de CHH mediante ensayos ELISA y de la concentración de glucosa en la hemolinfa posterior a la inyección de dopamina demuestran que no existen diferencias significativas en los niveles de ningunas de las dos variables cuantificadas con respecto al tiempo (Lorenzon *et al*., 2005). Estos trabajos sugieren que la acción de la dopamina en estos organismos es por una vía diferente a la mediada por CHH (Zou *et al*., 2003; Lorenzon *et al*., 2005).

El aumento en los niveles de glucosa obtenido en el presente trabajo a 1 h post-inyección tanto de dopamina como de la neurohormona CHH-$B1_{His}$ sugieren

que el efecto de la dopamina en *L. vannamei* es mediado a través de CHH-$B1_{His}$. Sin embargo, para confirmar lo anterior, es necesario realizar ensayos similares donde se administre la amina biogénica en organismos ablacionados y cuantificar también los niveles de lactato y/o cuantificar los niveles de CHH tras administrar dopamina.

VII. 3.1.2 Triglicéridos

La concentración de triglicéridos en organismos control fue de 72.453 mg/dl. En organismos tratados con solución salina (Fig. 23) la concentración de triglicéridos aumentó significativamente a las 0.5 h a 89.811 mg/dl, lo que representa un incremento del 24%, para descender a niveles cercanos al control. A partir de las 2 h aumentó significativamente hasta un valor máximo de 100.193 mg/dl a las 4 h representando un aumento del 38%, al contrario de la glucosa cuyo valor máximo se obtuvo a las 0.5 h para este tratamiento. Finalmente, a las 24 post-inyección, la concentración de triglicéridos regresó a un valor cercano al basal.

La concentración basal de triglicéridos obtenida en este trabajo difiere de lo observado en otros trabajos en *L. vannamei*. Racotta y Palacios (1998) y Pascual *et al*. (2004) reportan una concentración basal de aproximadamente 40 mg/dl para organismos juveniles cultivados a 28 ± 1 °C, y 35 y 32 ‰, respectivamente. En diferentes condiciones, Mercier *et al*. (2006), encuentran que juveniles mantenidos en estanques bajo techo a 25 ± 1 °C y 36 ‰ presentaron un valor basal de 35.2 mg/dl. Por otro lado, los valores obtenidos en nuestro trabajo son más parecidos a los reportados por Carreño-Mejía (2009), que encontró una concentración basal de 62.81 mg/dl en juveniles aclimatados a 28 ± 1 °C y 37 ± 1 ‰. Lo anterior concuerda también con lo reportado por González-Sánchez (2010) de 60 mg/dl en adultos aclimatados a 26 ± 1 °C y 35 ‰. Las diferencias con respecto a estos estudios probablemente pudieron tener bases nutricionales más que en las condiciones de cultivo u el estadio del ciclo de vida de los organismos.

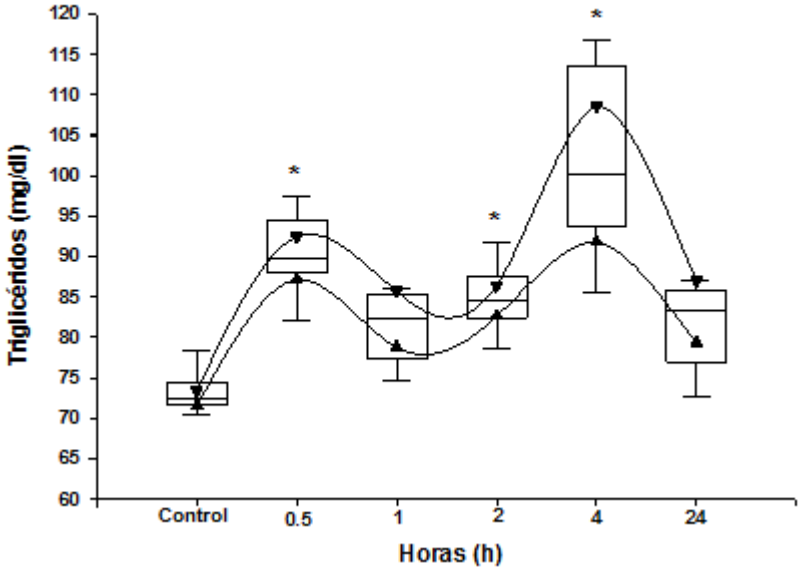

Figura 23. Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

Pascual *et al*. (2003), señalan que los triglicéridos son indicadores del efecto del alimento sobre el metabolismo de lípidos, siendo afectados por la cantidad y calidad de la dieta.

En el tratamiento con solución salina los niveles fueron significativamente altos a las 0.5, 2 y 4 h. Racotta y Palacios (1998) señalan que el estrés por manipulación en *L. vannamei* ocasionó una baja en los niveles de triglicéridos al inyectar solución salina. Por el contrario, Hsieh *et al*. (2008) reportaron un aumento progresivo en los niveles del metabolito debido al estrés por inyección y manipulación en *L. vannamei*. Posiblemente, la concentración de triglicéridos puede no ser un indicador tan eficaz como lo es la glucosa, cuyos niveles tras la inyección salina no aumentaron significativamente.

En crustáceos, se ha propuesto que los triglicéridos son preferencialmente catabolizados en condiciones de ayuno, debido a que no son componentes de las

membranas celulares como otras clases de lípidos (fosfolípidos y colesterol) (Lee *et al*., 1970). Puede ser que el ayuno impuesto previamente (24 h) ocasionara la movilización de los triglicéridos desde sus reservas a la hemolinfa como mecanismo homeostático para ejercer un efecto compensatorio.

Los niveles de triglicéridos en organismos inyectados con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (Fig. 24) presentaron un incremento gradual a partir de las 0.5 h, alcanzando la concentración máxima a las 2 h con un valor de 97.221 mg/dl, lo cual fue significativamente diferente al control. A las 4 h la concentración de triglicéridos empezó a descender gradualmente hasta alcanzar concentraciones menores a la basal.

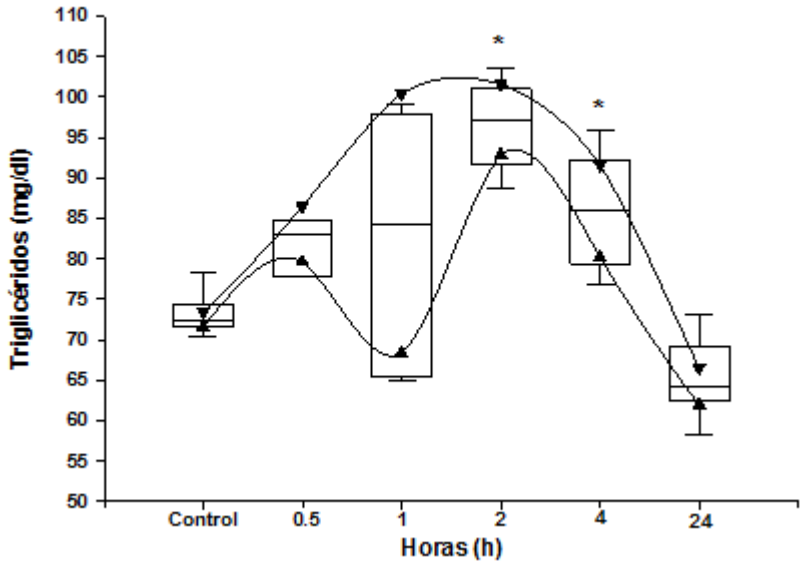

Figura 24. Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

Los resultados obtenidos para CHH-B1$_{His}$ sugieren un efecto hiperlipidémico. Santos *et al*., (1997), encontraron que la inyección de CHH purificada a partir de GS en cangrejos *Chasmagnatus granulata* ablacionados aumentó significativamente los niveles de lípidos totales y de triglicéridos en *Carcinus maenas* pasados 30 min post-inyección.

La respuesta en la concentración de triglicéridos encontrada en este trabajo mostró un patrón similar al que observamos en glucosa. Sugiriendo que la hormona CHH-B1 de *L. vannamei* tiene un efecto pleiotrópico ya que probablemente promovió a movilización de lípidos a la hemolinfa bajo condiciones de estrés. Por otro lado, la mayor respuesta en triglicéridos se dio a las 2 h post-inyección. Lo anterior es congruente con lo que se ha reportado sobre otras funciones adicionales asociadas a las neurohormonas CHH's de algunos crustáceos como la movilización de lípidos, la muda y la osmoregulación (Chang *et al*., 1990; Santos *et al*., 1997; Serrano *et al*., 2003).

Los niveles más altos de glucosa en *L. vannamei* se encontraron a 1 h post-inyección de CHH-B1$_{His}$ y los niveles más altos de triglicéridos hasta las 2 h post-inyección. Esto pudo deberse a que al ser la glucosa la fuente primaria de energía y al haber biodisponible en la hemolinfa, la movilización de triglicéridos fue más lenta y aumentó en plasma una vez que los niveles de glucosa comenzaron a bajar. En mamíferos se sabe que niveles bajos de glucosa sanguínea activan la hidrólisis de triglicéridos por lipasas y movilización de ácidos grasos mediante la acción del glucagon (Nelson y Cox, 2008); puede ser que tenga un efecto análogo en crustáceos por CHH-B1$_{His}$.

La concentración de triglicéridos en organismos inyectados con dopamina (Fig. 25), experimento un descenso significativo a partir de las 0.5 h post-inyección en comparación con los organismos control, hasta obtenerse un valor mínimo a las 24 h (52.364 mg/dl). Asimismo, la respuesta con dopamina fue diferente a la obtenida al inyectar solución salina.

A la fecha no existen trabajos en crustáceos donde se analice el efecto de la dopamina sobre los niveles de triglicéridos. Sin embargo, se ha estudiado el efecto de la inyección de serotonina.

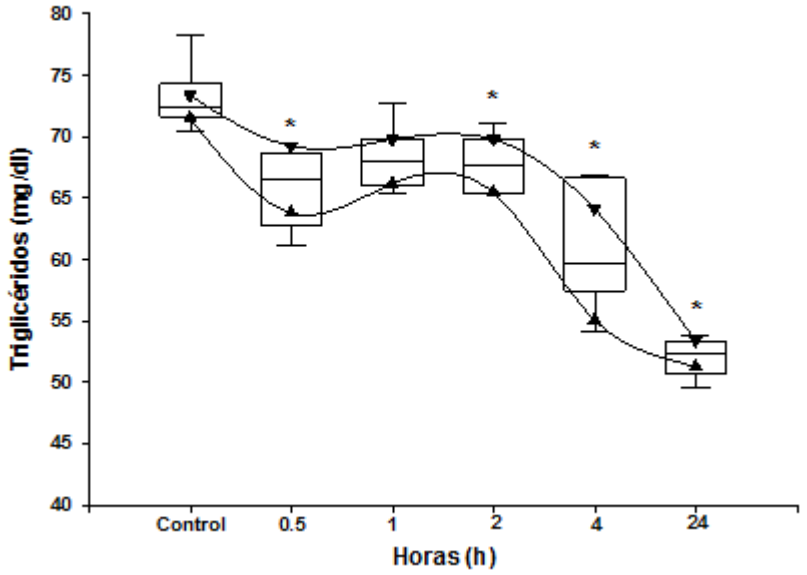

Figura 25. Concentración de triglicéridos obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

Racotta y Palacios (1998) observaron en *L. vannamei* que la inyección con el neurotransmisor serotonina, disminuye significativamente los triglicéridos después de las 2 h, sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, ellos observan que ocurre el mismo efecto con su control salino. Ellos sugieren que esta respuesta fue provocada por el requerimiento de energía producto del estrés. El patrón observado por ellos es similar al de este trabajo, sin embargo, los niveles comenzaron a disminuir significativamente pasadas 0.5 h de la aplicación del tratamiento, lo cual sugiere que el efecto metabólico de la dopamina sobre la estimulación del catabolismo de los triglicéridos en *L. vannamei* es mayor que el

de la serotonina. Sin embargo, el nivel de triglicéridos se mantuvo de 1-2 h de aplicado el tratamiento, evento que coincidió con el incremento en la glucosa, lo que posiblemente causó un cese en la utilización de los triglicéridos como fuente de energía y su posterior disminución, como se explicó para el tratamiento con CHH-$B1_{His}$.

Para confirmar este efecto metabólico, podría diseñarse un ensayo similar donde se inyecten organismos con dopamina y posteriormente se cuantifiquen también los niveles de glicerol y ácidos grasos en hemolinfa, los cuales son productos de la hidrólisis de los triglicéridos, y a diferencia de estos que funcionan como reservas energéticas son sustratos metabólicos directos (Nelson y Cox, 2008).

VII.3.1.3 Oxihemocianina, proteínas totales y relación oxihemocianina/proteínas totales

La concentración de oxhemocianina en organismos control fue de 0.742 mmol/l. En los animales tratados con solución salina (Fig. 26), la concentración fue similar al nivel basal en casi todos los tiempos y sólo se registró una baja significativa a las 4 h con una concentración de 0.707 mmol/l.

La concentración de oxihemocianina en el grupo control fue menor a las reportadas para *L. vannamei*. Racotta y Hernández-Herrera (2000) encontraron una concentración basal de 1.35 mmol/l para organismos juveniles mantenidos a 28 ± 1 °C y 39 ‰, mientras que Pascual *et al*. (2003) reporta una concentración de 1.5 mmol/l en juveniles cultivados en estanques bajo techo a una temperatura de 28 ± 1 °C y 32 ‰. Por otra parte, Chiu *et al*. (2007) encontraron una concentración basal de alrededor de 1.2 mmol/l en juveniles aclimatados a 27 ± 1 y 20 ‰. Estas diferencias con respecto a este trabajo pudieran deberse a las condiciones de aclimatación. La función principal de la hemocianina es el transporte de oxígeno (Zhang *et al*., 2009), y el consumo de oxígeno en crustáceos varía con la temperatura.

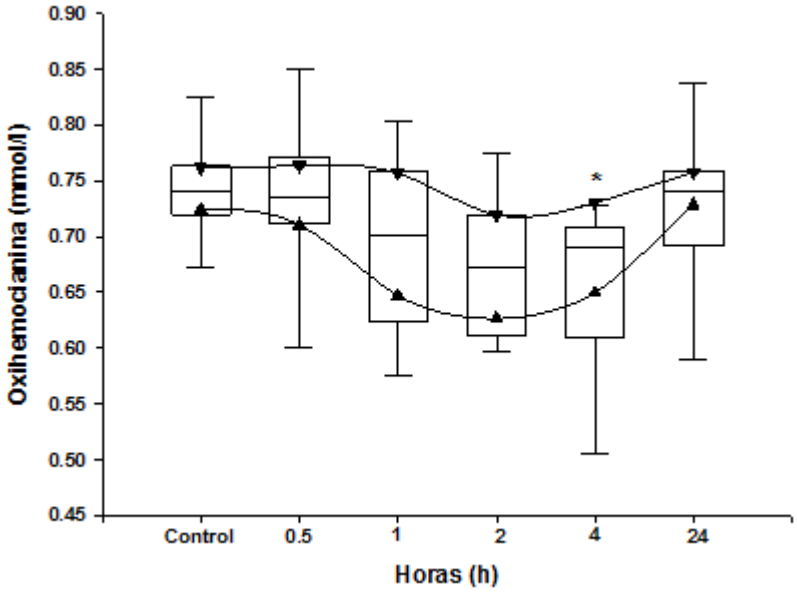

Figura 26. Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

González-Sánchez (2010) encontró que en *L. vannamei* el consumo de oxígeno aumentó conforme lo hace la temperatura de aclimatación. Aunque no existen estudios donde se relacionen los cambios en la concentración de hemocianina con respecto al consumo de oxígeno. Posiblemente esta pudo variar debido a las diferencias en el metabolismo de rutina a diferentes temperaturas de aclimatación que a su vez repercutirían sobre las demandas de oxígeno en los tejidos. Las diferencias en las temperaturas de aclimatación podrían explicar las diferencias en las concentraciones basales de oxihemocianina obtenidas en este trabajo con respecto a los estudios mencionados. La dieta también es un factor que afecta el contenido de oxihemocianina. Pascual *et al*. (2004), observaron que el contenido de carbohidratos en la dieta de *L. vannamei* afecta la concentración de oxihemocianina en la hemolinfa. Diferencias de origen nutricional estos estudios también pudieron de discrepancias en estos resultados.

La concentración de proteínas totales en la hemolinfa de *L. vannamei* en el grupo control fue de 147.924 mg/ml. En los organismos tratados con solución salina (Fig. 27) la concentración disminuyó significativamente entre las 2 y 4 h post-inyección, registrando el valor mínimo a las 4 h (67.114 mg/ml), para finalmente regresar cerca del nivel basal a las 24 h.

La concentración de proteínas basal fue similar a otras reportadas anteriormente para esta especie de 130 mg/ml, 122 mg/ml, 117.7 mg/ml, 140 mg/m por Racotta y Palacios (1998), Mercier *et al*. (2006), Sánchez-Campos *et al*. (2010) y Qiu *et al*. (2011), respectivamente.

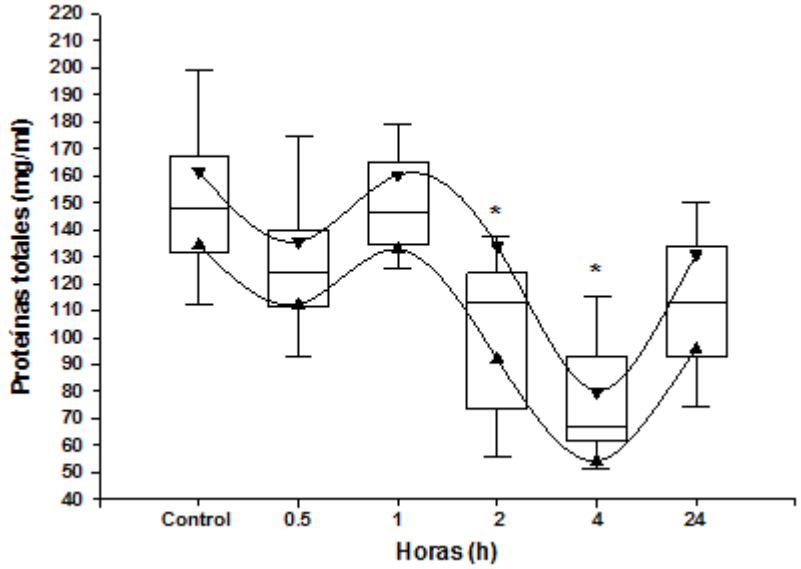

Figura 27. Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

El análisis de regresión lineal para la relación oxihemocianina/proteínas en los organismos inyectados con solución salina (Fig. 28) demostró que no existían

diferencias significativas con respecto al control para ningún tiempo. Sin embargo, el valor mínimo registrado fue 1 h post-inyección, siendo de 30.3% y el máximo fue a las 4 h con 64.9%, que es el tiempo en el que se obtuvo la menor concentración de proteínas totales y niveles significativamente más bajos de oxihemocianina en comparación con el control.

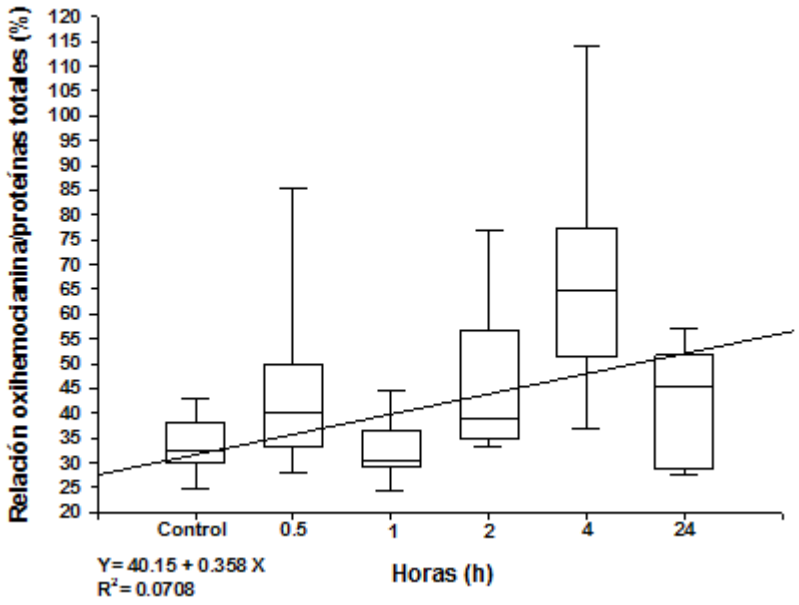

Figura 28. Análisis de regresión lineal (P<0.05) para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina. Las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles.

La hemocianina así como todas las proteínas plasmáticas funcionan como reserva energética y tienden a catabolizarse ante la falta de ingesta de alimento (Haggerman, 1983). Un efecto similar se observó en la concentración de proteínas totales durante las 2 y 4 h post-inyección. Por otra parte, aunque la relación oxihemocianina/proteínas se mantuvo prácticamente sin cambios, fue justamente

en estos dos tiempos que aumentó (no significativamente), lo cual indica un mayor consumo de otras proteínas diferentes a la oxihemocianina.

En animales bajo condiciones de ayuno los sustratos metabólicos primeramente consumidos son los lípidos, pero bajo ciertas condiciones también pueden recurrir al consumo de proteínas para mantener su metabolismo (McCue, 2010). La concentración de triglicéridos en el tratamiento salino (Fig. 23) aumentó significativamente entre las 2 y 4 h post-inyección producto de su movilización a la hemolinfa para ser utilizados; sin embargo, puede ser que el consumo de proteínas también ocurriera, produciendo en conjunto un efecto compensatorio para el mantenimiento las funciones fisiológicas.

Otra razón para estas fluctuaciones son los cambios en la ritmicidad de los procesos fisiológicos o bien, estrés por la inyección, tal como lo señala Chang *et al*. (2007), para *Penaeus monodon*, al inyectar solución salina hay descenso con respecto al control en los niveles de oxihemocianina tras 4 h. Aunque la inyección no tuvo un efecto sobre la concentración de glucosa en los organismos con solución salina (un indicador muy sensible al estrés) si lo pudo haber tenido sobre los niveles de proteínas.

La concentración de oxihemocianina en el tratamiento con CHH-B1$_{His}$ (Fig. 29) no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control. La concentración máxima se registró a 1 h (0.666 mmol/l) y la máxima a 0.5 h post-inyección (0.785 mmol/l).

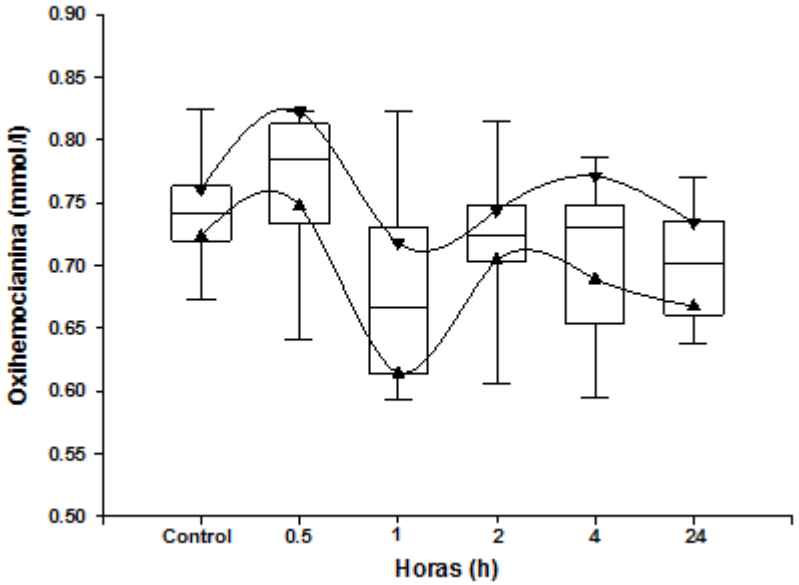

Figura 29. Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-$B1_{His}$ (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

Los niveles de proteínas totales en los organismos inyectados con la neurohormona (Fig. 30) experimentaron una baja significativa entre las 4-24 h post-inyección, registrando un valor más bajo a las 4 h de 115.5 mg/ml sin embargo, en este caso no se recuperó el nivel basal pasadas 24 h.

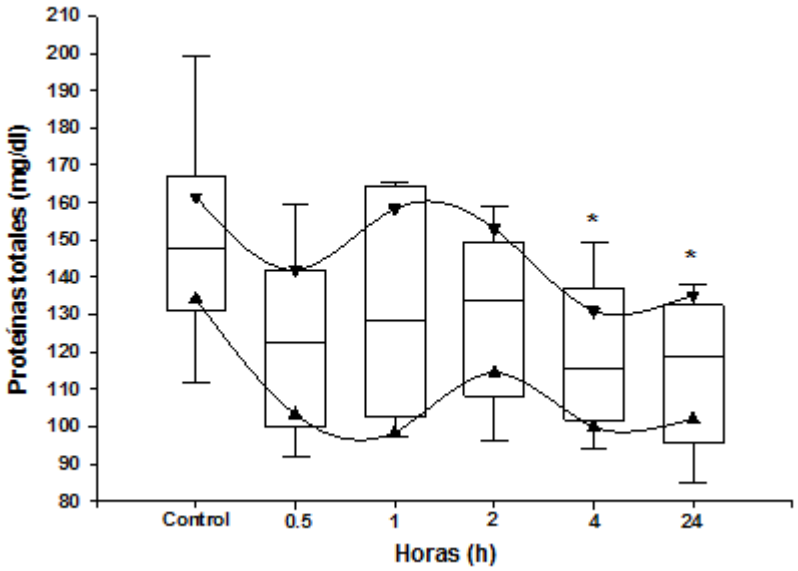

Figura 30. Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

La relación oxihemocianina/proteínas para los organismos inyectados con CHH-B1$_{His}$ (Fig. 31), al ser analizada mediante una regresión lineal simple, no mostró diferencias significativas con respecto al control en ningún tiempo. Sin embargo, el valor más bajo registrado fue de 35.4% a las 2 h post-inyección y el máximo fue a las 24 h con 45.3%.

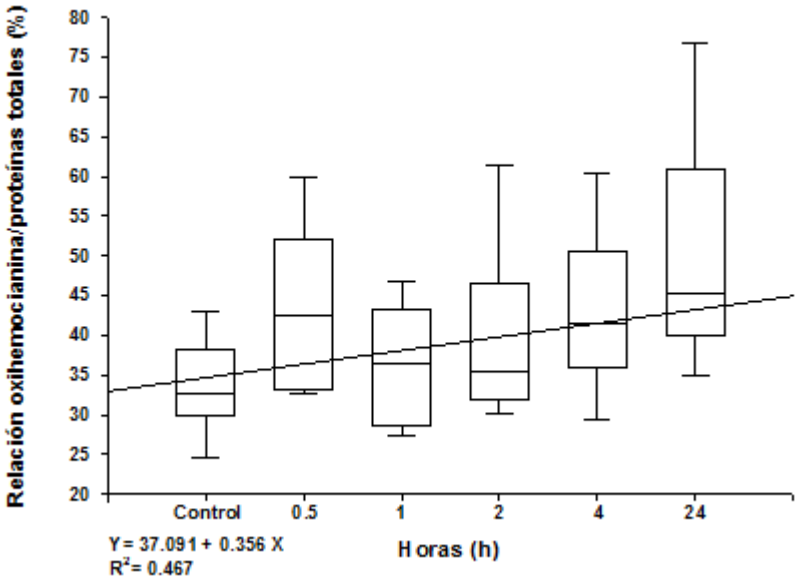

Figura 31. Análisis de regresión lineal (P<0.05) para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$. Las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles.

En el tratamiento con CHH-B1$_{His}$ no hubo una modificación significativa de la concentración de oxihemocianina pero si en la concentración de proteínas, la cual disminuyó entre las 4-24 h, provocando un aumento (no significativo) en la relación oxihemocianina/proteínas.

Existen numerosos estudios sobre la función hiperglucémica de CHH (Fanjul-Moles, 2006) y también sobre su posible efecto hiperlipidémico (Santos *et al*., 1997), pero a la fecha no existe alguna evidencia directa sobre si tiene alguna función en el metabolismo de proteínas. Los cambios de la presión osmótica en la hemolinfa para este ensayo están asociados a dos eventos metabólicos; el aumento en la concentración de glucosa entre las 0.5-2 h y la baja en la concentración de proteínas. En este sentido, la neurohormona CHH-B1$_{His}$ pudiera tener un papel en la osmorregulación, como se ha sugerido para otras CHH's (Serrano *et al*., 2003).

Arruda-Freire *et al*. (2003) señalan que la inyección de homogenados de pedúnculos oculares en *Macrobrachium olfersii* y la transferencia de los organismos desde una salinidad alta a una baja aumenta la concentración de prolina como aminoácido libre. Los aminoácidos libres funcionan compensando la osmolaridad de los fluidos extracelulares (McNamara *et al*., 2004).

En *Penaeus japonicus* la exposición a amonio indujo a un aumento en los aminoácidos libres en la hemolinfa producto del catabolismo de la hemocianina y proteínas (Chen *et al*., 1994). Por los resultados que obtuvimos, es posible que la alteración de la osmolaridad en la hemolinfa producto de inyección de la neurohormona haya conducido al catabolismo de las proteínas circulantes para compensar el efecto osmótico producto de la hiperglucemia, contribuyendo a una disminución gradual de la osmolaridad (ver apartado VII.3.1.4) cuando el efecto hiperglucémico empezó a desaparecer, ya que la glucosa alcanzó niveles cercanos al basal a las 4 h post-inyección.

En los camarones inyectados con dopamina (Fig. 32) la concentración de oxihemocianina no experimento diferencias significativas, sin embargo la mínima registrada fue de 0.629 mmol/l a las 24 h y la máxima de 0.776 mmol/l una hora después de administrar el neurotransmisor.

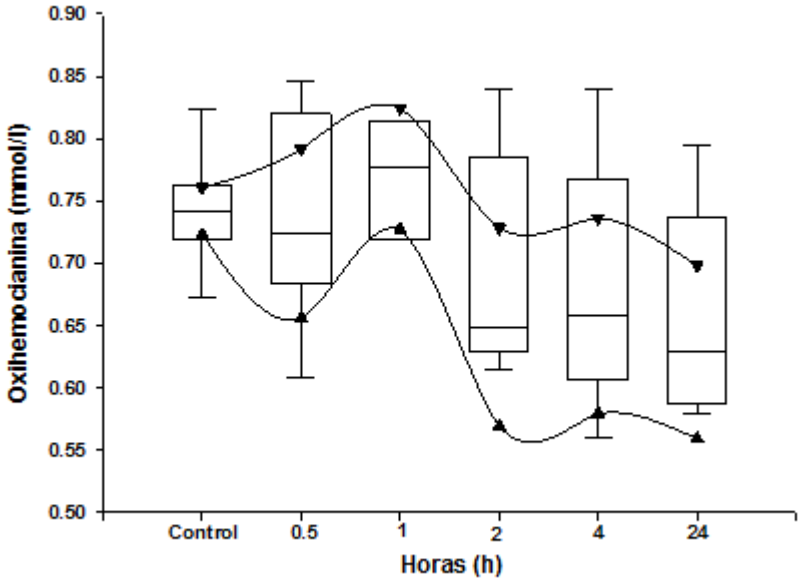

Figura 32. Concentración de oxihemocianina obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

La concentración de proteínas tampoco manifestó diferencias significativas con respecto al control en los camarones tratados con dopamina (Fig. 33), ya que el nivel mínimo se encontró a las 24 h (147.936 mmol/l) y el máximo se registró a las 4 h (180.186 mmol/l) de administrada la dopamina.

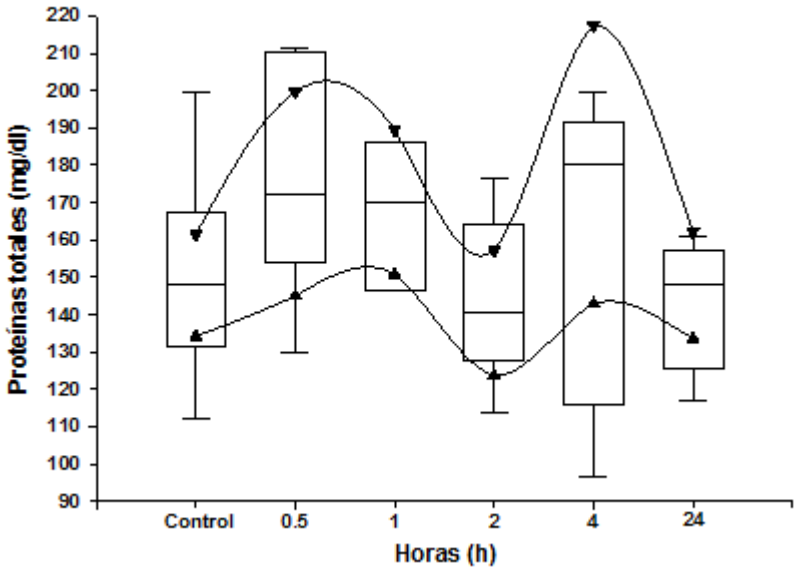

Figura 33. Concentración de proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

En cuanto a la relación oxihemocianina/proteínas en el tratamiento con dopamina (Fig. 34), el análisis de regresión lineal mostró que no existen diferencias significativas con respecto al nivel basal en ninguno de los tiempos. El menor nivel se registró a las 0.5 h (26.397%) y el máximo a las 2 h post-inyección (29.931%).

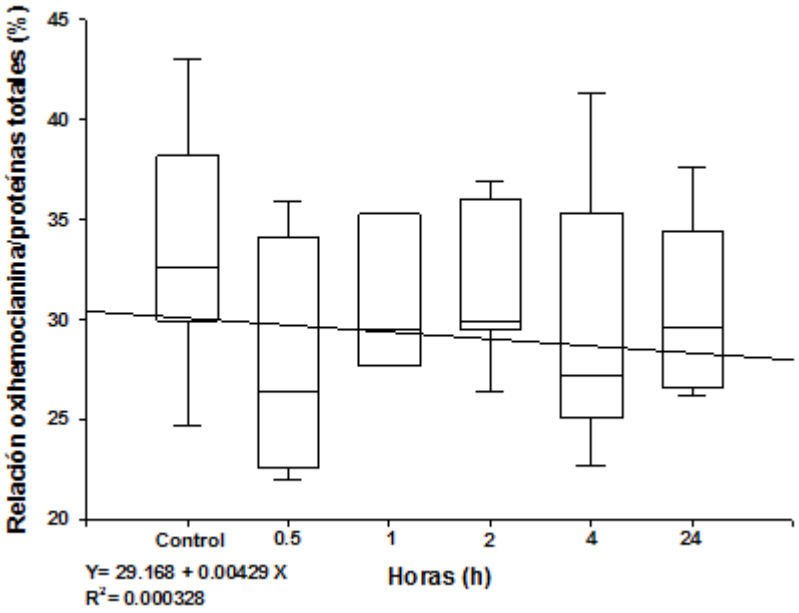

Figura 34. Análisis de regresión lineal (P<0.05) para la relación oxihemocianina/proteínas totales obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina. Las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles

La inyección con dopamina no ocasionó ninguna modificación significativa en la concentración de oxihemocianina y proteínas, así como en la relación oxihemocianina/proteínas. Al comparar la concentración de proteínas totales posterior al administrar dopamina con respecto a los otros dos tratamientos (sol. salina y CHH-$B1_{His}$). Se puede observar que con dopamina se obtuvieron concentraciones ligeramente más elevadas de proteína y con más fluctuaciones, por lo cual los porcentajes oxihemocianina/proteínas tienden a ser más bajos. No obstante, la concentración de oxihemocianina se mantuvo prácticamente sin cambios significativos con respecto a los otros dos tratamientos. Estos resultados difieren de otros estudios donde se administró esta misma catecolamina a peneidos. La inyección de dopamina a juveniles de *L. vannamei*, mantenidos a 27 °C y 20 ‰ (Chiu *et al*., 2006) y a 24 °C y 26 ‰ (Liu *et al*., 2008) provocó una elevación de la concentración de proteínas, lo que condujo a una disminución

temporal de la relación oxihemocianina/proteínas). El mismo patrón fue observado por Chang *et al*. (2007) en *Penaeus monodon* aclimatados a 27 °C y 25 ‰. Estos autores sugieren que en las condiciones probadas la dopamina promueve la movilización de proteínas a la hemolinfa y mejora la utilización del oxígeno por el metabolismo aerobio, y a su vez disminuye la concentración de oxihemocianina. Existen diferencias con lo observado por estos autores con respecto a lo obtenido en el presente trabajo. Por un lado, la diferencia en salinidad, en nuestro estudio los organismos se mantuvieron en condiciones hiper-osmóticas (35 ‰). Díaz *et al*. (2001) encontraron que las mayores demandas energéticas para cubrir el metabolismo de rutina ocurrieron en la mayor salinidad probada (32 ‰) y los valores intermedios fueron obtenidos en la salinidad de 20 ‰. Resultados similares han sido obtenidos por Rosas *et al*. (2001).

VII.3.1.4 Presión osmótica y capacidad osmorreguladora

La presión osmótica (PO) obtenida en el grupo control fue de 713.5 mOsmol/kg. Los resultados de la PO en *L. vannamei* después de la inyección con solución salina (Fig. 35) demuestran que esta variable presenta diferencias significativas entre 0.5-4 h. La PO se incrementa entre las 0.5 y 1 h presentándose un máximo de 750.5 mOsmol/kg a 1 h de aplicado el tratamiento. La PO empezó a disminuir a las 2 h post-inyección hasta llegar a un nivel cercano al control a las 24 h. Esto se reflejó en una mejoría de la capacidad para hipo-osmorregular en los organismos.

La capacidad osmorreguladora (CO) para el grupo control fue de -259.167 mOsmol/kg. En organismos tratados con solución salina (Fig. 36) hubo un cambio significativo en la CO entre las 0.5-4 h post-inyección, disminuyendo a -221.5 mOsmol/kg después de 1 h. Posteriormente aumentó a partir de las 2 h de administrado el tratamiento, y finalmente bajó a un nivel cercano al basal a las 24

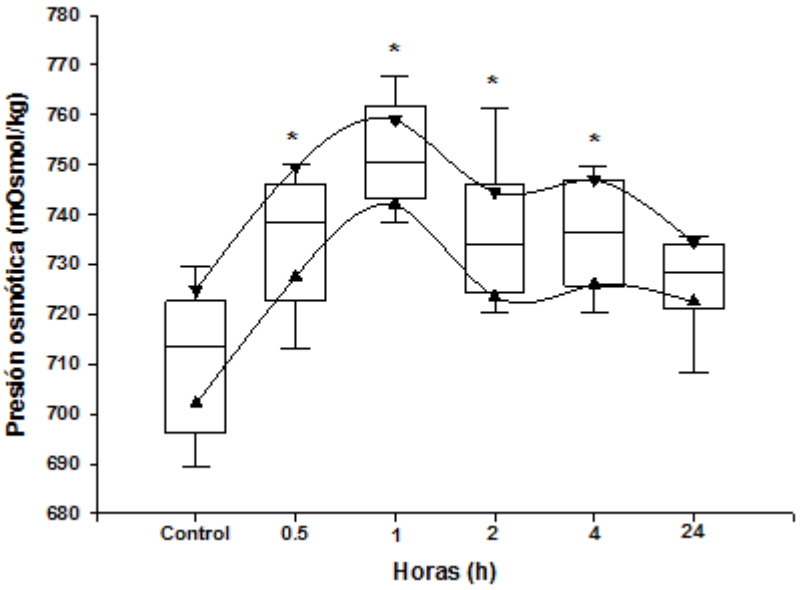

Figura 35. Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

La PO y/o la CO registrada para los organismos control en condiciones hipo-osmóticas (35 ‰) y a 26°C fue similar a otras reportadas anteriormente para *L. vannamei*. Chiu *et al*. (2006) y Yeh *et al*. (2006) observaron una PO basal de alrededor de 710 mOsmol/kg en juveniles aclimatados a 27 ± 1°C y 20 ‰. Por otra parte, el valor obtenido fue también similar a los obtenidos en las puntos isosmóticos para juveniles de esta especie (25-26 ‰) aclimatados a 24 y 28 °C de 713 y 712 mOsmol/kg, respectivamente (Díaz *et al*. ,2001).

En lo que respecta a la CO del grupo control, esta fue 104% mayor a la reportada por Galindo *et al*. (2009) que fue de -270 mOsmol/kg para juveniles en intermuda aclimatados a 29 ± 0.5°C y 36 ‰ y 72% menor a la encontrada por Flores-Ibarra (2007) en juveniles aclimatados a 28 ± 1°C y 35 ‰ (-187 mOsmol/kg). El patrón de regulación presentado por los organismos a lo largo de

los experimentos realizados en el presente trabajo fue hipo-osmótico, lo cual fue lo esperado para una salinidad de 35 ‰.

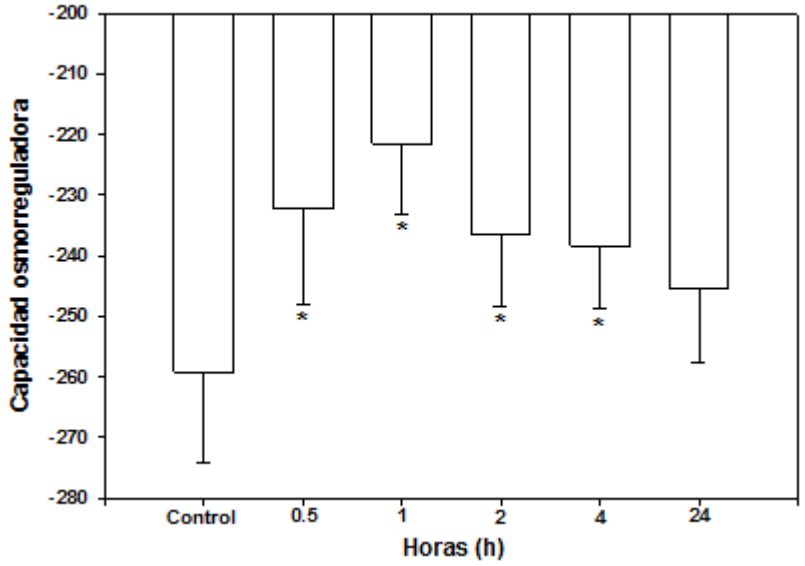

Figura 36. Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con solución salina (0.5-24 h). (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

La osmorregulación es una de los mecanismos homeostáticos más importantes en organismos acuáticos y en crustáceos ha sido muy utilizada para el monitoreo de las funciones fisiológicas frente diferentes condiciones ambientales y nutricionales (Lignot *et al*., 1999; Lignot *et al*., 2000).

Los iones Na^+ y Cl^- constituyen cerca del 90% de la presión osmótica de la hemolinfa de crustáceos decápodos. El principal sitio de intercambio iónico son las branquias, las cuales pueden sufrir cambios estructurales y funcionales bajo condiciones de estrés, como modificaciones del flujo de iones y alteraciones de la permeabilidad de la superficie branquial (Lignot *et al*., 2000). Aunque el estrés de la inyección salina no tuvo una respuesta significativa en la concentración de

glucosa plasmática, la cual puede funcionar como osmolito, otros factores como el catabolismo de proteínas y la liberación de aminoácidos libres, o bien otros no cuantificados como cambios en la concentración de iones podrían explicar lo observado.

En organismos inyectados con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (Fig. 37), ocurrió un aumento significativo en la PO entre las 0.5-1 h, con un valor máximo de 756.5 mOsmol/kg. Esto representa un aumento del 106% con respecto al control. A las 2 h los valores descendieron hasta un valor cercano al nivel basal para volver a aumentar significativamente entre las 4-24 h post-inyección.

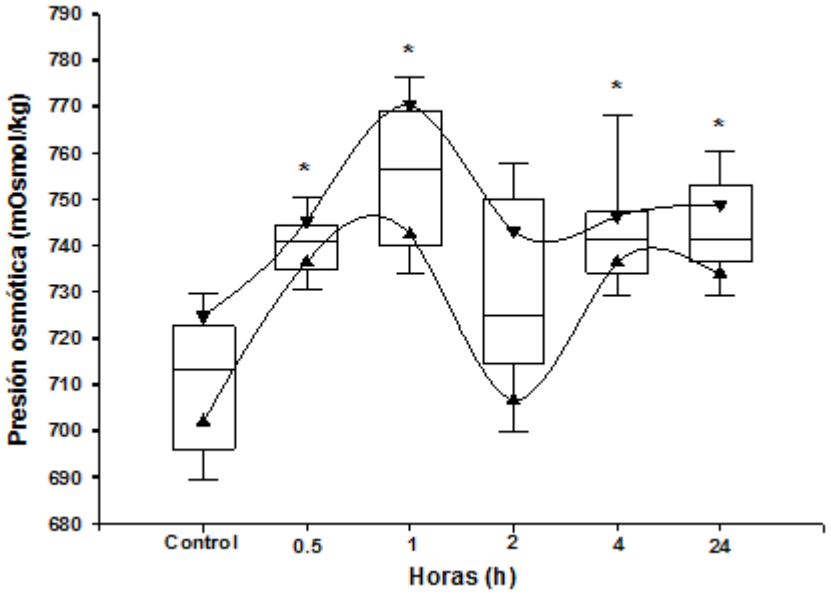

Figura 37. Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

La CO en camarones inyectados con CHH-B1$_{His}$ (Fig. 38) disminuyó significativamente entre las 0.5-1 h, con un valor de -238 mOsmol/kg. Pasado este

tiempo los valores registrados no mostraron diferencias significativas con la CO del grupo control.

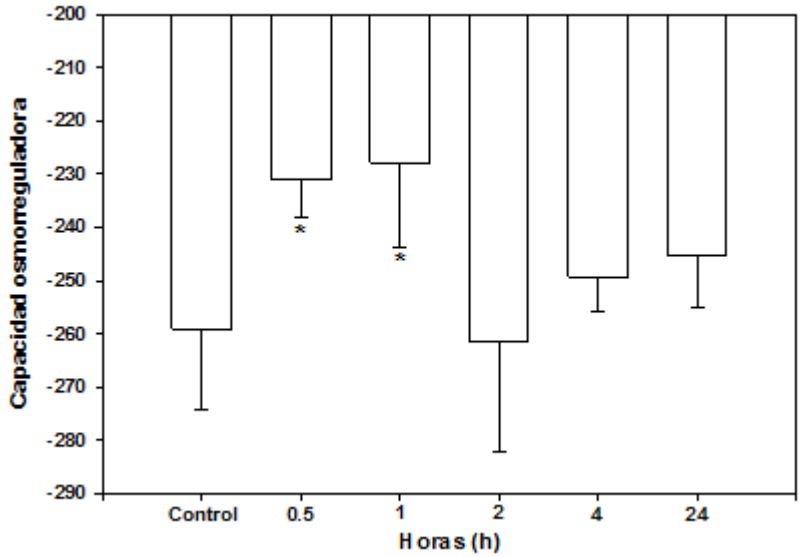

Figura 38. Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ (0.5-24 h). (*) Diferencias significativas con respecto al control (P<0.05).

Los valores de PO y CO obtenidos en organismos inyectados con CHH-B1$_{His}$ mostraron un patrón similar en 0.5 y 1 h post inyección en comparación con los obtenidos al inyectar solución salina. Sin embargo, a las 2 h se observó un aumento en la capacidad de los organismos para hipo osmoregular, la cual se mantiene en valores similares al control. Los incrementos en la PO de los organismos inyectados con CHH-B1$_{His}$ corresponden con el aumento significativo en la concentración de glucosa (0.5-1 h post-inyección) y la disminución en la concentración de proteínas en la hemolinfa (4-24 h post-inyección).

La inyección con la neurohormona CHH-B1$_{His}$ promovió el incremento de la CO y la restauración de los niveles basales a las 2 h. Esto fue posiblemente debido al flujo glucolítico en la primera hora post-inyección, lo que a su vez

proporcionó la energía necesaria para mover en un sentido u otro el intercambio de iones a través de las branquias (Fanjul, 2006).

En estudios anteriores se ha sugerido que la neurohormona CHH-$B1_{His}$ interviene en los procesos de osmorregulación en *L. vannamei*. Esto debido a que su expresión a nivel de ARNm con respecto a otras isoformas varía de acuerdo a las condiciones de salinidad y temperatura (Lago-Lestón *et al*., 2007; Sigala-Andrade, 2010). Los mayores niveles de ARNm cuantificados de manera absoluta en pedúnculo ocular se encontraron a 26 °C y 40 ‰; condiciones similares a las de este trabajo. Bajo estas condiciones también se expresó en las branquias posteriores (Sigala-Andrade, 2010).

En *Astacus leptodactylus* ablacionados y aclimatados a bajas salinidades, la CO disminuyó un 50% con respecto al grupo control, y la inyección de fracciones de extractos de GS que contienen CHH's promovió su incremento alterando la permeabilidad de iones Na^+ hacia la hemolinfa (Charmantier-Daures *et al*., 1994). Según lo propuesto por Spanings-Pierrot *et al*. (2000) para *Pachygrapsus marmoratus*, puede ser consecuencia de la estimulación vía glucogenolítica que favorece el incremento del transporte activo vía ATPasa Na^+/K^+ en la membrana transepitelial de las branquias posteriores.

En organismos inyectados con dopamina la PO (Fig. 39) se elevó significativamente entre las 0.5-2 h post-inyección. El valor máximo se obtuvo a las 4 h y fue de 803 mOsmol/kg. Aunque la PO disminuyó a las 24 h post-inyección, la PO no regresó al nivel basal.

En la CO en organismos tratados con dopamina (Fig. 40) se obtuvieron diferencias significativas con el control a lo largo de todo el tratamiento. La CO mínima registrada según el patrón hipo-osmótico fue de -177.3 mOsmol/kg a las 4 h post-inyección.

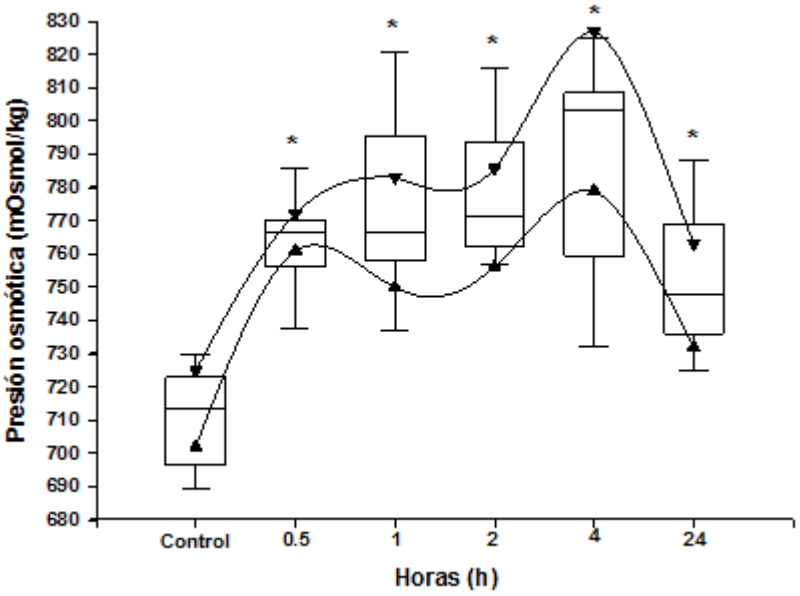

Figura 39. Presión osmótica obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). El área delimitada entre los triángulos representa los intervalos de confianza de la mediana al 95%, las barras incluyen el 50% de la distribución de los datos y las líneas verticales representan los cuartiles. (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

De acuerdo con lo observado hubo una reducción de la CO entre las 0.5-4 h post-inyección provocado por el aumento en la PO en esos tiempos. El aumento en la concentración de glucosa para este tratamiento pudo haber tenido un efecto sobre la PO. Sin embargo, la menor CO se observó a las 4 h después de la inyección. Estos resultados coinciden con los de Liu *et al*. (2008) para *L. vannamei*; sus resultados demuestran que la inyección de dopamina a una concentración de 10^{-6} mol/camarón provoca un aumento significativo en la PO a dentro de las 6 primeras horas posteriores a la inyección y de la concentración de iones Na^+ y Cl^-, así como un descenso significativo de la concentración de iones K^+. Este patrón fue previamente observado por Chang *et al*. (2007) para *P. monodon* donde ocurrió una elevación transitoria de la PO, Na^+, así como una disminución de Cl^- en la hemolinfa dentro de las 2-8 h post-inyección de dopamina.

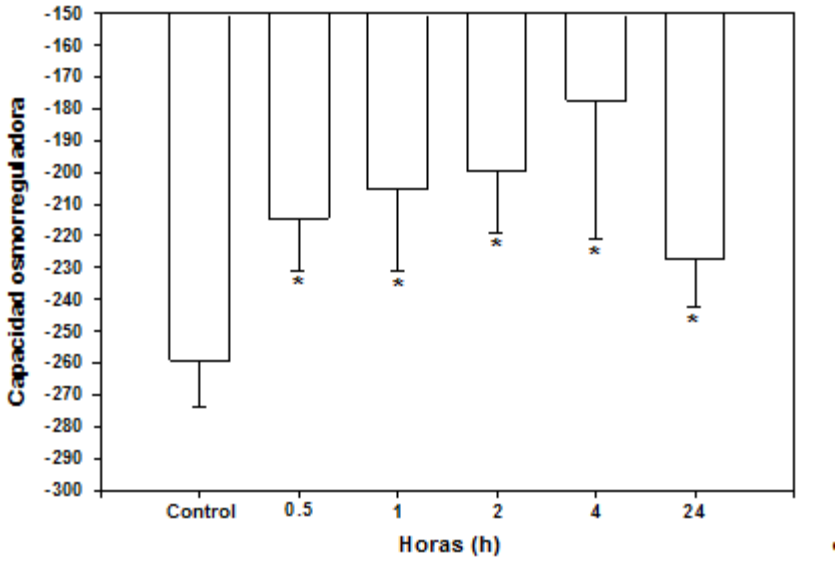

Figura 40. Capacidad osmorreguladora obtenida en la hemolinfa de *L. vannamei* antes (control) y después de la inyección con dopamina (0.5-24 h). (*) Diferencias significativas con respecto al control ($P<0.05$).

Estos resultados, sumados a la evidencia anterior sugieren que la dopamina en *L. vannamei* tiene un efecto modulador de la osmorregulación. Posiblemente, el mecanismo de acción es mediante la modificación permeabilidad iónica vía ATPasa. Se ha observado que la dopamina liberada principalmente por el órgano pericárdico en decápodos incrementa los niveles de AMPc en las branquias, intensificando la actividad Na^+/K^+ ATPasa y la incorporación de iones Na^+ (Mo *et al*., 2002; Halperin *et al*., 2004). Sin embargo, la falta de información acerca de esas variables no permite confirmarlo.

VIII. Conclusiones

Se integró la construcción pPicZαA/CHH-B1 en el genoma de la cepa KM71 de *P. pastoris* y se determinó que las condiciones óptimas para su expresión son a una concentración de 2% de metanol durante 3 días.

Se expresó y purificó la neurohormona CHH-$B1_{His}$ con un rendimiento de 5.72 mg/L.

Tanto CHH-$B1_{His}$ como la dopamina tuvieron efectos sobre el metabolismo de *L. vannamei* en condiciones hiper-osmóticas.

La inyección de 2 µg de la neurohormona CHH-$B1_{His}$ provocó hiperglucemia con un valor máximo a 1 h post-tratamiento, un aumento en la concentración de triglicéridos con una concentración máxima a las 2 h y una disminución de la concentración de proteínas a las 4-24 h post-inyección.

Dado el efecto osmótico observado en el tratamiento con CHH-$B1_{His}$ y la disminución de la concentración de proteínas totales al restablecerse los niveles de glucosa en la hemolinfa, se sugiere que CHH-$B1_{His}$ pudiera activar el catabolismo de proteínas como efecto compensatorio para originar aminoácidos libres como efectores osmóticos.

La inyección de dopamina a una concentración de $2x10^{-6}$ moles/camarón provocó el aumento de los niveles de glucosa con un valor máximo a 1 h post-inyección y la disminución progresiva de triglicéridos. Sin embargo, los niveles de proteínas se mantuvieron sin cambios significativos.

Los niveles de oxihemocianina disminuyeron ligeramente a lo largo de los experimentos con dopamina y CHH-B1, aunque no de manera significativa, por lo que tampoco se observó un cambio significativo en la relación oxihemocianina/proteínas en comparación con el control.

El aumento en los niveles de glucosa a 1 h post-inyección tanto de dopamina como de la neurohormona CHH-$B1_{His}$ sugieren que el efecto de la dopamina en *L. vannamei* es mediado a través de CHH-$B1_{His}$.

La inyección de dopamina provocó el aumento de los niveles de proteínas en comparación con los otros tratamientos (solución salina y CHH-$B1_{His}$), lo que sugiere que posiblemente la dopamina promueva la movilización de proteínas a la hemolinfa y mejorando el metabolismo aerobio en *L. vannamei*.

La inyección de la neurohormona CHH-$B1_{His}$ provocó un aumento en la presión osmótica de organismos sub-adultos de *L. vannamei* posiblemente como consecuencia del aumento de la concentración de glucosa y el catabolismo de proteínas. Asimismo, mejoró la capacidad para hipo-osmorregular de los organismos reflejado en un aumento de la capacidad osmorreguladora.

La dopamina provocó un incremento en la presión osmótica y redujo la capacidad osmorreguladora en camarones *L. vannamei* sub-adultos, sugiriendo su efecto como neuromodulador de la activación de mecanismos de osmorregulación.

IX. Perspectivas

La realización de ensayos con organismos ablacionados permitiría confirmar que el efecto hiperglucémico observado en *L. vannamei* con dopamina esta mediado a través de CHH-B1$_{His}$.

En el caso de la neurohormona CHH-B1, es necesario continuar trabajando en la expresión y purificación de su forma nativa para evitar interferencias por parte del extremo C-terminal adicional en su actividad.

Para hacer más claro el papel de CHH-B1 y de la dopamina en la osmorregulación de *L. vannamei* se podrían llevar a cabo ensayos donde se cuantifiquen variables osmóticas como las estudiadas en este trabajo así como otras por ejemplo, la actividad Na^+/K^+ ATPasa y la concentración de AMPc en branquias, la concentración de iones y aminoácidos libres en hemolinfa.

X Literatura Citada

Aguilar, M.B., D. Soyez, R. Falchetto, D. Arnott, J. Shabanowitz, D. Hunt y A. Huberman. 1995. Aminoacid sequence of the minor isoform of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a d-amino acid. Peptides.16: 1375-1383 p.

Alvarado-Álvarez, R., M.G. Porras-Villalobos, G. Calderón-Rosete, L. Rodríguez-Sosa y H. Aréchiga. 2005. Dopaminergenic modulation of neurosecretory cells in the crayfish. Cellular and Molecular Neurobiology. 25(2): 345-370 p.

Aparicio-Simón, B., M. Piñon, R. Racotta y I.S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. Aquaculture. 298: 308-314 p.

Armour, Carl L. 1991. Guidance for Evaluating and recommending temperature regimes to protect fish. U.S. Fish Wildl. Serv., Biol. Rep. 90(22). 13 p.

Arruda-Freire, C., J.C. MacNamara, J.C.. Rosa y L.W. Greene. 2003. Neuroendocrine Control of Osmotic Regulation in the Freshwater Shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): Free Amino Acid Concentrations in the Hemolymph. General and Comparative Endocrinology. 100(1): 83-91 p.

Bayne, B.L. 1975. Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis L*., with respect to the effects of oxygen tension and salinity. En: Barnes, H (ed.) :Prnc 9th European Marine Biology Symposium. Oban, Escocia, 2-8 de Octubre. Aberdeen University Press, Aberdeen. 213-238 p.

Bimboim, H.C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research. 7(6): 1513-1523 p.

Böcking, D., Dirkensen, H. y Keller, R. 2002. The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. En: Korand, W. (ed). The Crustacean Nervous System. Springer Berlin. Alemania. 84-97 p.

Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.72: 248-254 p.

Briggs, M., S. Funge-Smith, R. Subasinghe. y M. Phillips. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO RAP Publication. 10: 32 p.

Bulau, P., I. Meisen, I. y B. Reichwein-Roderburg. 2003.Two genetic variants of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the Australian crayfish, *Cherax destructor*: detection of chiral isoforms due to posttranslational modification. Peptides.24: 1871–1879 p.

Carreño-Mejía, A. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Mazatlan, México. UNAM. 115 p.

Chang E.S, G.D. Prestwich y M.J. Bruce. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt inhibiting and hyperglycemic activitie in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem. Biophys Res Comm. 171(2): 818 -826 p.

Chang, E.S., R. Keller y S.A. Chang. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA en hemolymph of the lobster *Homarus americanus*, following various stresses. General and Comparative Endocrinology. 111: 359-366 p.

Chang, E.S., S.A. Chang, R. Keller, P.S. Reddy, M.J. Snyder y J.L. Spees. 1999. Quantification of stress in lobsters: crustacean hyperglycemic hormone, stress proteins, and gene expression. Amer. Zool. 39: 487-495 p.

Chang, E.S. 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. Integr. Comp. Biol. 45: 43-50 p.

Chang, C.C., Z.R. Wu, C.S. Chen, C.M. Kuo y W. Cheng. 2007. Dopamine modulates the physiological response of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 270: 333-342 p.

Charmantier-Daures, M., G. Charmantier, K.P. Janssen, D.E. Aiken y F. van Herp. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 94: 281-293 p.

Charmantier, G. y Anger, K. 1999. Ontogeny of osmoregulation in the palaemonid shrimp *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda). Mar. Ecol. Prog. Ser. 181: 125-129 p.

Chen, J.C. y Cheng, S.Y. 1993. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of Penaeus japonicus based on sex, size and moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol. 106B: 293-296 p.

Chen, J.C., T.C. Chen y S.Y. Cheng. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of Penaeus monodon exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110: 85-94 p.

Chen, S.H., C.Y. Lin. y C.M. Kuo. 2004. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. Mar. Biotechnol. 6: 83-94 p.

Chen, S.H., C.Y. Lin y C.M. Kuo. 2005. *In silico* analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. Marine biotechnology. 7: 193-206.

Chiu, H., S. Yeh, S. Huang, C. Chang, C. Kuo y W. Cheng. 2007. Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 251: 558-566 p.

Chung, J.S., M.C.Wilkinson y S.G. Webster. 1998. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in Cancer pagurus. Regul. Pept. 77:17–24 p.

Chung, J.S. y Webster, S.G. 2003. Moult cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. From target to transcript. Eur. J. Biochem. 270: 3280-3288 p.

Chung, J.S. y Webster, S.G. 2006. Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and hindgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: A possible osmoregulatory role. General and Comparative Endocrinology. 147: 206-213 p.

Chung, J.S. y N. Zmora. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, Callinectes sapidus – the expression and

release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. The FEBS Journal. 275(4): 693-704 p.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids. Res. 16(22): 10881-10890 p.

Cregg, J.M., J.L. Cereghino, J. Shi y D.R. Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Molecular Biotechnology. 16(1): 23-52 p.

Davis, D.A., T.M. Samocha y C.E. Boyd. 2004. Acclimating Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to inland, low-salinity waters. SRAC Publication No. 2061.

Davey, M.L., M.R. Hall y R.H. Willis. 2000. Five crustacean hyperglycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA sequences and identification in single sinus gland by electrospray ionization-fourier transform mass spectrometry. Mar. Biotechnol. 2: 80–91 p.

De Kleijn, D.P.V. y Van Herp, F. 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. Comp. Biochem. Physiol.112B: 573-579 p

Díaz, F, C. Farfán, E. Sierra y A.D. Re. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmorregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 34: 93-104 p.

Dircksen, H., D. Böcking y U. Heyn. 2001. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. Biochem. J. 356: 159-170 p.

Dorgelo, J. 1981. Blood osmorregulation and temperature in crustaceans. Hydrobiologia. 81: 113-130 p.

Escamilla-Chimal, E.G., F. Van-Herp y M.L. Fanjul-Moles. 2001. Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. The Journal of Experimental Biology. 204: 1073-1081 p.

Fanjul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapods crustaceans: review and update. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 142: 390-400 p.

FAO. 2006. FAO species catalogue, Vol.1- shrimps and prawns of the world. FAO Fisheries Synopsis. 125(1): 253 p.

FAO. 2007. Producción mundial de acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., por especies principales en 2007. Anuarios de estadísticas de Pesca. A-6: 44 p.

Fenucci, J.L. 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. FAO Project Reports. 8: 93 p.

Fingerman, M., R. Nagabhushanam, R. Sarojini y P.S. Reddy. 1994. Biogenic Amines in Crustaceans: Identification, Localization, y Roles. Journal of Crustacean Biology. 14(3): 413-437 p.

Fingerman, M. 1997. Crustacean endocrinology: A restrospective, prospective, and introspective analysis. Physiological Zoology. 70(3): 257-269 p.

Flores-Ibarra, M. 2007. Efecto de astaxantina sobre respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas en el camarón blanco Litopenaeus vannamei aclimatado a baja salinidad. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 53 p.

Fossati, P y Lorenzo, P. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin. Chem. 28: 2077-2080 p.

Galindo, C., G. Gaxiola, G. Cuzon y x. Chiappa-Carrara. 2009. Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. Journal of Crustacean Biology. 29(4): 544-549 p.

García, S. y Le Reste, L. 1986. Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros. FAO Doc. Tec. Pesca. 203: 180 p.

Giulianini PG, N. Pandolfelli, S. Lorenzon, E.A. Ferrero y P. Edomi. 2002. An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan crustacea. Cell Tissue Res. 307: 243- 254 p.

González, R.A., F. Díaz, A. Licea, A.D. Re, L.N. Sánchez, Z. García-Esquivel. 2010. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white

shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. Journal of Thermal Biology. 35: 218-224 p.

Gu, P.L., K.L. Yu y S.M. Chan. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. FEBS Lett. 472: 122–128 p.

Hagerman, L. 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. Marine Biology. 17: 11-17 p.

Halperin, J., G. Genovese, M. Tresguerres y C.M. Luquet. 2004. Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulates* by dopamine and cAMP. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 139: 103-109 p.

Hsieh, S.L., Y.H. Ruan, Y.C. Li, P.S. Hsieh, C.H. Hu y C.M. Kuo. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 275(1-4): 335-341 p.

Hsu, Y.W.A., D.I. Messinger, J.S. Chung, S.G. Webster, H.O. De la Iglesia y A.E. Christie. 2006. Members of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) peptide family are differentially distributed both between and within the neuroendocrine organs of *Cancer* crabs: implications for differential release and pleiotropic function. The Journal of Experimental Biology. 209: 3241-3256 p.

Hsu, A.Y., J.R. Weller, A.E. Christie y H.O. De la Iglesia. 2008. Molecular cloning of four cDNAs encoding prepro-crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the eyestalk of the red rock crab *Cancer productus*: Identification of two genetically encoded CHH isoforms and two putative post-translationally derived CHH variants. Gen. Comp. Endocrinol. 155: 517-525 p.

Huberman, A., M.B. Aguilar, K. Brew, J. Shabanowitz y D.F. Hunt. 1993. Primarystructure of the major isoform of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman): interspecies comparison. Peptides. 14: 7–16 p.

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture. 121:191-208 p.

Huberman, A., M.B. Aguilar, I. Navarro-Quiroga, L. Ramos, I. Fernández, F.M. White y D.F. Hunt. 2000. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) schmitti*. Peptides. 21(3): 331-338 p.

Karovičová, J. y Kohajdová, Z. 2005.Biogenic amines in food. Chem. Pap. 59(1): 70-79 p.

Katayama, H., T. Ohira, K. Aida y H. Nagasawa. 2002. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. Peptides. 23: 1537-1546 p.

Khayat, M., W.J. Yang, K. Aida, H. Nagasawa, A. Tietz, B. Funkenstein y E. Lubzens. 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 110 (3):307-318 p.

Kegel, G., B. Reichwein, S. Weese, G. Gaus, J. Peter-Katalinic y R. Keller. 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, Carcinus maenas. FEBS Lett. 255 (1): 10–14 p.

Kegel, G., B. Reichwein, C. Tensen y R. Keller. 1991. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. Peptides. 12 (5): 909–913 p.

Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. Experentia. 48: 439-448 p.

Kuo, C., C. Hsu, y C. Lin. 1995. Hyperglycemic effects of dopamine in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 135: 161-172 p.

Lago-Lestón, M.A., E. Ponce y M.E. Muñoz. 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. Aquaculture. 270: 343-357 p.

Larentis, A.L., M.S. Almeida, K.M.S. Cabral, L.N. Medeiros, E. Kurtenbach y M.A.Z. Cohelo. 2004. Expression of *Pisum sativum* Defensin 1(*Psd*1) in shaking flasks and bioreactor cultivations of recombinant *Pichia pastoris* at different pHs. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 21(02): 155-164 p.

Laufer, H., E. Homola y M. Landau. 1991. Hormonal regulation of reproduction in female crustacea. NOAA. Technical Report NMFS 106. 89-98 p.

Lee, R.F., J.C. Nevenzel, G.A. Paffenhöfer y A.A. Benson. 1970. The metabolism of wax esters and other lipidsby the marine copepod, *Calanus helgolandicus*. Journal of Lipid Research. 11: 237-240 p.

Lee C.Y., P.F. Yang y H.S. Zou. 2001. Serotogenic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish, *Procambarus clarki*. Physiological and Biochemical Zoology. 74(3): 376-382 p.

Lee K.J., R.M Doran y D.L. Mykles . 2007. Crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: cloning, isoforms, and tissue expression. Gen Comp Endocrinol. 54: 174-83 p.

Lignot, J.H., J.C. Cochard, C. Soyez, P. Lemaire y G. Charmantier. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus* stylirostris. Aquaculture. 170: 79-92 p.

Lignot, J.H., C. Spanings-Pierrot y G. Charmantier. 2000. Osmorregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture. 191: 209-245 p.

Liu, H., L. Pan y D. Zheng. 2008. Injection of biogenic amines modulates osmoregulation of *Litopenaeus vannamei:* Response of hemolymph osmotic pressure, ion concentration and osmolality effectors. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 151: 191-197 p.

López-Rodríguez, H. 2009. Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de *Litopenaeus vannamei* (Liv2-CHH-SG2) en *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 66 p.

Lorenzon, S., P. Edomi, P.G. Giulianini, G. Mettulio y E. Ferrero. 2004.Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. The Journal of Experimental Biology. 207: 4205-4213 p.

Lorenzon, S., P. Edomi, P.G. Giulianini, G. Mettulio y E. Ferrero. 2005. The role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress responses. The Journal of Experimental Biology. 208: 3341-3347 p.

Lüschen, W., A. Willing, P.P Jaros. 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus meanas L*. Comp. Biochem. Physiol. 105C: 291-296 p.

Lutterschmidt, W.I. y Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. Can. J. Zool. 75: 1561-1574 p.

Mancera-Flores, J.M. 2009. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales con capacidad de reconocimiento de la neurohormona Liv-CHH-SG1 de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 106 p.

Marco, H.G., I.A. Hansen, K. Scheller y G. Gade. 2003. Molecular cloning and localization of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from the South African spiny lobster, *Jasus lalandii*. Peptides. 26(6): 845-851 p.

McCue, M.D. 2010. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. Comp. Biochem. Physiol. Part A. http://www.elsevier.com/locate/cbp.

McNamara, J.C., J.C. Rosa, L.J. Greene y A. Agusto. 2004. Free amino acids pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olferssi* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 37(3): 193-208 p.

Mercier, L., E. Palacios, A.I. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera y I.S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture. 258: 633-640 p.

Mettulio, R., P. Edomi, E.A. Ferrer, S. Lorenzon y P.G. Giulianini. 2004. The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the preprohormone but not in the mature peptide. Peptides. 25: 1899-1907 p.

Mo, J.L., P. Devos y G. Trausch. 1998. Dopamine as modulator of ionic transport and Na^+/K^+ ATPase activity in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. Journal of Crustacean Biology. 18(3): 442-448 p.

Mo, J.L., P. Devos y G. Trausch. 2002. Dopamine D_1 receptors in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 131: 433-438 p.

Morris S., P. Greenaway, A.M. Adamczewska, y M. Ahern. 2000. Adaptations to a terrestrial existence in the Robber Crab *Birgus latro* L. IX. Hormonal control of post-renal urine reprocessing and salt balance in the branchial chamber. J. Exp. Biol. 203: 389–396 p.

Mosco, A., P. Edomi, C. Guarnaccia, S. Lorenzon, S. Pongor, E.A. Ferrero y P.G. Giulianini. 2008. Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. Regulatory Peptides. 147: 88-95 p.

Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2008. Lehninger principles of biochemistry. W.H. Freeman. Quinta edición. New York. 1100 p.

Ohira, T., T. Watanabe, H. Nagasawa y K. Aida. 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zool. Science. 14: 785-789 p.

Pascual, C., G. Gaxiola y C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and comparision with other crustacean species. Marine Biology. 142: 735-745 p.

Pascual, C., L. Arena, G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela y C. Rosas. 2004. Effect of size-based selection program on blood metabolites and immune responses of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. Aquaculture. 230: 405-416 p.

Pérez-Castañeda, R. y Defeo, O. 2005. Growth y mortality of transient shrimp populations (*Farfantepenaeus spp*.)in a coastal lagoon of Mexico: role of environment and density-dependence. ICES Journal of Marine Science. 62:14-24 p.

Pérez-Jar, L., T. Rodríguez-Ramos, L. Ramos, Y. Guerra-Borrego y I.S. Racotta. 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. Aquaculture. 252: 591-597 p.

Ponce-Palafox, J., C.A. Martínez-Palacios, L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931. Aquaculture. 157: 107-115.

Qiu, J., W.N. Wang, L. Wang, Y.F. Liu y A.L. Wang. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C. xxx: xxx-xxx p.

Racotta, I.S. y Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 29(3): 351-356 p.

Racotta, I.S. y Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic Responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 125: 437-443 p.

Re, A.D., F. Díaz, G. Valdez. 2006. Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. Journal of Thermal Biology. 31: 506-513.

Reddy, P.S. y Ramamurthi, R. 1999. Recent trends in crustacean endocrine research. *PINSA*. 1-2: 15-32 p.

Rosas C., G. Cuzon, G. Gaxiola, Y. Lepriol, C. Pascual, J. Rossignyol F. Contreras, A. Sánchez, y A. Van Wormhoudt. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 259: 1-22 p.

Sainz-Hernández, J.C., I.S. Racotta, S. Dumas y J. Hernández-López. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. Aquaculture. 283: 188-193 p.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimatation. Aquaculture. 198: 13-28 p.

Sánchez-Campos, L.N., F. Díaz, A. Licea, A.D. Re, M.L. Lizarraga, M. Flores, R. González-Sánchez y C.T. Romero. 2010. Efecto de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* sobre las respuestas fisiológicas y metabólicas de *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio campbellii*. Hidrobiológica. 20(3): 246-255 p.

Sánchez-Castrejón, E. 2007. Producción de la hormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 138 p.

Sanchez-Castrejón, E. Ponce-Rivas, M.B. Aguilar y F. Díaz. 2008. Molecular cloning and expresión of a putative crustacean hyperglycemic hormone of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. Electronic. J. Biotechnol. 11(4): Issue October. http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue4/full/4/.

Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 340: 184-193 p.

Santos, E.A., L.E. Maia-Nery, R. Keller, A.A. Gonçalves. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. Physiological Zoology. 70(4): 415-420 p.

Sarojini, R., R. Nagabhushanam y M. Fingerman. 1995. Dopaminergic and enkephalinergic in- volvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Gen. Comp. Endocrinol. 97:160–170 p.

Schägger, H. y von Jagow G. 1987. Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. Anal. Biochem. 166(2):368-379 p.

Serrano, L., G. Blanvillain, D. Soyez, G. Charmantier, E. Grousset, F. Aujoulat. y C. Spanings-Pierrot. 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus Leptodactylus*. The Journal of Exp. Biology. 206, 979-988 p.

Serrano, L., E. Grousset, G. Charmantier, y C. Spanings-Pierrot. 2004. Occurrence of L- and D-crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the eyestalk X-organ/sinus gland complex during the ontogeny of the crayfish *Astacus leptodactylus*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 52(9): 1129-1140 p.

Sigala-Andrade, H.M. 2010. Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón

blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 100 p.

Sneddon, L.U., A.C: Taylor, F.A. Huntingford. Y D.G: Watson. 2000. Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. The Journal of experimental biology. 203: 537-545 p.

Spanings-Pierrot, C., D. Soyez, F. van Herp, M. Gompel, G. Skaret, E. Grousset y G. Charmantier. 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 119: 340-350 p.

Tensen, C.P., D.P.V. De Kleijn. Y F. Van Herp. 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormone from the lobster *Homarus americanus*. Eur. J. Biochem. 200:103–106 p.

Treerattrakool, S., L. Eurwilaichitr, A. Udomkit y S. Panyim. 2002. Secretion of Pem-CMG, a peptide in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* is directed by secretion signal of the α-mating factor from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 35(5): 476-481 p.

Treerattakool, S., A. Udomkit y S. Panyim. 2006. Anti-CHH antibody caused impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 39(4): 371-376 p.

Trinder, P.1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6: 24-25 p.

Tukey, J.W. 1977. Exploratory data analysis. Addison-Wesley. Primera edición. Reading. 688 p.

Udomkit, A., S. Treerattrakol y S. Panyim. 2004. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. J. Exp. Mar. Ecol. 298: 79-91 p.

Valdez, G., F. Díaz, A.D. Re y E. Sierra. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). Hidrobiológica. 18(2): 105-115 p.

Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán y J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies in penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. 106A(2): 299-303 p.

Villate, F., A.S. Hussein, T.T. Bachmann y R.D. Schmid. 2001. Expression levels of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 463-465 p.

Von Bohlen, O. y Dermietzel, M. 2006. Neurotransmiters and neuromodulators. Wiley-VCH. Segunda Edición. Weinheim. 386 p.

Wanlem, S., K. Supamattaya, C. Tantikitti, P. Prasertsan y P. Graidist. 2010. Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology. 30: 877-885 p.

Webster, S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. The Journal of Experimental of Biology. 199: 1579-1585 p.

Yang, W.J., K. Aida y H. Nagasawa. 1997. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides. 18: 479-485 p.

Yasuda, A., Y. Yasuda, T. Fujita y Y. Naya. 1994. Charaterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*); multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. Gen. Comp. Endocrinol. 95: 387-398 p.

Yeh, S.P., H.T. Chiu y W. Cheng. 2006. Norepinephrine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *L. Vannamei*. Aquaculture. 254: 693-700 p.

Zar, H.J. 1999. Biostatistical analysis. Prentice-Hall. Cuarta edición. New Jersey. 663 p.

Zarubin, T.P., E.S. Chang y D.L. Mykles. 2009. Expression of recombinant eyestalk crustacean hyperglycemic hormone from the tropical crab, *Gecarcinus lateralis*, that inhibits Y-organ ecdysteroidogenesis *in vitro*. Mol. Biol. Rep. 36: 1231-1237 p.

Zatta, P., 1987. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo- osmotic stress of *Carcinus maenas*. Mar. Biol. 96: 479-481 p.

Zhang, Y., F. Yan, Z. Hu, X. Zhao, S. Min, Z. Du, S. Zhao, X. Ye y Y. Li. 2009. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. Fish & Shellfish Immunology. 27: 330-335 p.

Zou H, C. Juan, S. Chen, H. Wang y C. Lee. 2003. Dopaminergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone and glucose levels in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Zool. 298: 44-52.

XI Anexos

A.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de lísis alcalina

El siguiente protocolo modificado de Bimboim y Doly. (1979) se realiza a partir de cultivos de *E. coli* transformados con el plásmido de interés crecidos en medio LB líquido durante una noche.

Procedimiento:

1. Del cultivo en medio LB transferir 1.5 ml a un tubo de microcentrífuga estéril y se centrifugar a 14, 000 rpm durante 30 s.
2. Decantar el sobrenadante y resuspender con vórtex el paquete celular en 1 ml de solución I (sacarosa 20%, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 50 mM). Centrifugar durante 1 min.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 150 µl de solución I.
4. Añadir 2.5 µl de ARNasa A/T1 Mix (RNasa A 2 mg/ml, RNasa T1 (500 U/ml)) (Fermentas), resuspender por vórtex y agregar 350 µl de mezcla lítica (solución II) (SDS 1%, NaOH 0.2 N). Mezclar por vórtex e incubar en hielo durante 10 min.
5. Agregar 250 µl de solución III (acetato de sodio 3.0 M pH 4.8), mezclar por inversión e incubar en hielo durante 20 min. Centrifugar por 5 min.
6. Recuperar el sobrenadante. Añadir un volumen de isopropanol absoluto, mezclar por inversión y centrifugar durante 5 min.
7. Decantar el sobrenadante y adicionar 1 ml de etanol al 70%. Resuspender mediante vórtex y centrifugar por 5 min.
8. Decantar el etanol y secar el tubo invertido a temperatura ambiente. Resuspender el ADN en 60 µl de agua destilada estéril.

A.2 Purificación de fragmentos largos de PCR por medio de fenol congelado

Procedimiento:

1. Cortar los fragmentos de interés del gel de agarosa y distribuirlos en tubos de microcentrífuga (aproximadamente menos de la mitad de cada tubo).
2. Agregar a cada tubo un volumen de fenol equilibrado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Mezclar por vórtex y congelar en hielo seco durante 5 min. Incubar a 55 °C durante 2 min. Repetir hasta disolver completamente la agarosa.
3. Centrifugar las muestras congeladas a 14,000 rpm durante 15 min. Recuperar los sobrenadantes y agregar 400 µl de fenol en cada tubo. Mezclar con vórtex y centrifugar 2 min. Agregar 400 µl más de fenol y centrifugar.
4. Recuperar el sobrenadante y añadir 15 µl de NaCl 5 M por cada 100 µl de mezcla y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión y congelar en hielo seco 15 minutos. Centrifugar 10 min.

Nota: En este paso es importante recuperar el sobrenadante sin nada de fenol.

5. Decantar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol absoluto. Resuspender por vórtex y centrifugar durante 5 min.
6. Decantar el sobrenadante y dejar secar el ADN en el tubo invertido. Resuspender en 18 µl de agua destilada estéril.

A.3 Preparación de células electrocompetentes de la cepa KM71 de *P. pastoris* (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen)

Procedimiento:

1. Sembrar la cepa sin transformar en placas con medio YPD-agar 1.5% (extracto de levadura 1%; peptona 2%; D-glucosa 10%, agar 1.5%). Incubar incubadas a 30 °C hasta observar colonias.
2. Inocular una colonia aislada en un tubo con 3 ml de medio YPD (extracto de levadura 1%; peptona 2%; D-glucosa 10%) e incubar a 30 °C y 250 rpm durante 18 h.
3. Inocular 0.5 ml del cultivo anterior en 250 ml de medio YPD hasta alcanzar una DO_{600}=1.65.
4. Centrifugar el cultivo en tubos cónicos a 1500 x *g* a 4 °C durante 5 min. Resuspender la biomasa mediante vórtex en 250 ml de agua desionizada estéril fría y se centrifugar.
5. Resuspender el botón celular en 125 ml de agua desionizada estéril fría y centrifugar. El paquete celular se debe resuspender 10 ml de sorbitol 1 M frío y se centrifugarse de nuevo.
6. Resuspender la biomasa en 0.5 ml de sorbitol 1 M frió y conservada en hielo hasta electroporar.

A.4 Transfección del vector pPicZαA a *Pichia pastoris* (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

Nota: Para llevar a cabo este protocolo previamente se requiere contar con células electrocompetentes frescas de la cepa de *P. pastoris* a utilizar y al menos 5 µg del vector linearizado en un volumen ≈10 µl. Esto puede realizarse mediante digestión por enzimas de restricción, o por medio de PCR con los plásmidos PicFor y PicRev (López-Rodríguez, 2009).

Procedimiento:

1. Incubar una cubeta de electroporación de 0.2 cm en hielo durante 5 min. Después agregar 80 µl de las células electrocompetentes y 5 µg del plásmido linearizado en 10 µl.
2. Colocar la cubeta en el equipo de electroporación MicroPulser Electroporator (BIO-RAD) y dar un pulso bajo las condiciones preestablecidas para *P. pastoris* (2.0 kv, 25 µF, 200 c, 5 ms).
3. Inmediatamente añadir 1 ml de sorbitol 1 M frío a la cubeta y resuspender aspirando con una pipeta.
4. Transferir el contenido de la cubeta a un tubo cónico estéril e incubar durante 1 h a 30 °C. Después, agregar 1 ml de medio YPD e incubar 1 h a 30 °C y 250 rpm.
5. Sembrar 200 µl del cultivo en placas de medio YPDS-agar 1.5% (extracto de levadura 1%; peptona 2%; D-glucosa 10%; sorbitol 1 M) con Zeocina (Invitrogen) (100 µg/ml) e incubar a 30 °C hasta observar colonias.
6. El resto del cultivo se incuba 3 horas más y se debe sembrar en otras placas con YPDS-agar 1.5% con Zeocina (Invitrogen) (100 µg/ml) e incubar a 30 °C por hasta observar la presencia de colonias.

A.5 Electroforesis desnaturalizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE)

A) Preparación de solución acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)

Para 100 ml, mezclar:
50 ml de agua destilada
38.67 g de acrilamida
1.33 g de bisacrilamida
Aforar volumen con agua destilada
Almacenar a temperatura ambiente

B) Amortiguador del gel (Tris 3 M, SDS 0.3%, pH 8.45)

Para 100 ml, mezclar:
40 ml de agua destilada
36.34 g de tris base
Ajustar pH a 8.45 (HCl 100%)
Aforar volumen con agua destilada
0.3 g de SDS Almacenar a 4 °C

C) Preparación del gel de poliacrilamida 16.5% mezclar:

Gel separador:
770 µl de agua destilada estéril
2300 µl de solución de acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)
600 µl de glicerol
1800 µl de amortiguador del gel
30 µl de persulfato de amonio (10%)
5 µl de TEMED

Llenar ¾ de los vidrios con esta solución, añadir 250 µl de metanol al 100% y dejar polimerizar durante aproximadamente 45 min.
Enjuagar el metanol con agua destilada y secar la superficie de los vidrios con papel secante. Después preparar el gel concentrador.

Gel concentrador:
1580 µl de agua destilada estéril
320 µl de solución de acrilamida:bisacrilamida, 29:1 (40%)
600 µl de amortiguador de gel
25 µl de persulfato de amonio (10%)
3 µl de TEMED
Llenar la parte faltante del vidrio, colocar el peine y dejar polimerizar durante aproximadamente 30 min.

Nota: Para que el gel solidifique de manera adecuada la solución de persulfato de amonio al 10% debe estar recién preparada.

D) Amortiguadores de electroforesis

Amortiguador del cátodo (10X) (Tris Base 1M, pH 8.25, SDS 1%)
Para 250 ml, mezclar:
150 ml de agua destilada
30.28 g de tris base
44.79 g de tricina
Ajustar pH a 8.25 (HCl 100%)
Aforar a volumen con agua destilada
2.5 g de SDS
Almacenar a 4 °C

Amortiguador del ánodo (10X) (Tris Base 2M, pH 8.9)

Para 250 ml, mezclar:

150 ml de agua destilada

60.57 g de tris base

Ajustar pH a 8.9 (HCl 100%)

Aforar volumen con agua destilada

Almacenar a 4 °C

A.6 Detección de proteínas recombinantes que contienen el epítopo *c-myc* por medio de Western blot (electrotransferencia semiseca)

A) Electrotransferencia

1. Colocar el gel de poliacrilamida (sólo el separador) una vez concluida la electroforesis en un recipiente con amortiguador de transferencia Towbin 1X (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) e incubar en agitación moderada a temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Saturar 3 piezas de papel filtro Whatman 3MM con Towbin 1X y poner sobre el ánodo del sistema de electrotransferencia.
3. Saturar 1 pieza de membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm Trans-blot Transfer Medium (BIO-RAD) con Towbin 1X y sobre el papel filtro. Colocar el gel de poliacrilamida encima cuidadosamente.
4. Colocar otras 3 piezas de papel filtro Whatman 3MM saturadas en amortiguador de transferencia sobre el gel.

Nota: Se puede hacer rodar una varilla de vidrio para aplanar el papel y el filtro Se puede hacer rodar una varilla de vidrio para aplanar el papel y evitar que queden burbujas.

5. Colocar el cátodo y un peso encima de la cámara cerrada (puede ser un matraz de 1 l lleno de agua hasta la mitad).
6. Realizar la electrotransferencia por 1 hora a 200 mA constantes y un voltaje máximo de 20 V.

B) Detección con el anticuerpo

1. Bloquear la membrana con solución bloqueadora PBST (PBS 100%, Tween-20 0.05%) con 5% de leche descremada en polvo por 3 horas en agitación moderada a temperatura ambiente.
2. Eliminar solución bloqueadora y lavar con PBST.
3. Incubar la membrana con en solución de anticuerpo (PBS 100%, Tween-20 0.05%, leche descremada en polvo 1%, anti- *myc*-HRP (Invitrogen) 1:3500)) a 4 °C toda la noche.
4. Eliminar la solución de anticuerpo y lavar la membrana con PBST 4 veces durante 10 min.
5. En oscuridad colocar la membrana en un acetato y verter 2 ml de solución de quimioluminiscencia Enhanced chemiluminescence ECL (Amersaham Biosciences). Incubar 5 min a temperatura ambiente. Colocar otro acetato encima y pasar un papel absorbente para eliminar el exceso de solución.
6. Transferir a un casete de revelado y cubrir con película fotosensible durante 1 min.
7. Revelar la película sumergiéndola en solución reveladora 15 s, agua, solución fijadora 1 min, y de nuevo agua.

A.7 Purificación de proteínas con etiqueta de polihistidinas por cromatografía de afinidad en condiciones nativas (ProBond Purification System, Invitrogen)

A) Preparación de la columna

1. Resuspender la resina en su frasco invirtiendo repetidamente.
2. Verter 2 ml de resina a una columna de purificación (10 ml) montada en un soporte universal, dejarla asentar por gravedad (5-10 min) y aspirar suavemente el sobrenadante o dejarlo salir por debajo de la columna cuidando que quede un menisco.
3. Adicionar 6 ml de agua desionizada estéril a la columna, colocar la tapa y resuspender la resina invirtiendo la columna varias veces. Dejar asentar por gravedad y aspirar el sobrenadante.
4. Agregar 6 ml de amortiguador de Unión Nativo 1x (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), resuspender por inversión y dejar asentar por gravedad, aspirar el sobrenadante.
5. Repetir el paso anterior sin eliminar el amortiguador de Unión Nativo 1x.

B) Preparación de la muestra

1. Descongelar la muestra a purificar y ajustar el pH (7.5-8.0).
2. Transferir la muestra a tubos cónicos de 50 ml y centrifugar (10, 000 x *g*, 20 min, 4 °C). Decantar el sobrenadante cuidadosamente evitando remover las partículas del fondo.
3. Mantener la muestra en hielo mientras hasta proceder con su purificación. Tomar 1 ml de muestra y almacenar a -20 °C para su análisis por Tricina-SDS-PAGE.

C) Purificación

1. Colocar la columna previamente preparada en un soporte universal en el cuarto frío (4 °C) y eliminar el amortiguador de unión nativo.
2. Transferir la muestra a la columna por gravedad. Para ello se deberá colocar el recipiente con la muestra por arriba del nivel de la columna y deberá contar con una manguera por la cual será transferida la muestra. Colocar un recipiente en el extremo inferior de la columna para recuperar la muestra una vez que ha pasado por la columna.
3. Pasar la muestra 2 veces por la columna. Tomar 1 ml para analizar por Tricina-SDS-PAGE y guardar el resto a -20 °C hasta asegurar que se tenga la proteína purificada.
4. Una vez que la totalidad de la muestra ha pasado a través de la columna proceder al lavado a temperatura ambiente. Lavarla con 12 ml de amortiguador de lavado nativo con imidazol (Imidazol 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). Mezclar por inversión, dejar asentar la resina y eliminar sobrenadante. Este paso se repite 3 veces más.
5. Recuperar el amortiguador de lavado y tomar una alícuota de 1 ml para su análisis por SDS-Tricina-PAGE y almacenar el resto a -20 °C.
6. Eluir las proteínas con 1 ml de amortiguador de elución con imidazol (Imidazol 250 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) Recuperar el mililitro en un tubo. Repetir 5 veces. Tomar 50 µl de cada una de las 5 alícuotas para su análisis por Tricina-SDS-PAGE. Almacenar a -20 °C.
7. Si se va a utilizar la columna al día siguiente, lavarla con 5 ml de amortiguador de elución y después con 5 ml de agua desionizada estéril. Equilibrarla con amortiguador de unión nativo 1X. Si ya no se va a utilizar ponerle etanol al 20% como preservativo y guardar a temperatura ambiente.

A.8 Cuantificación de proteínas por medio del método del ácido bicinconínico con el kit BCA protein assay (PIERCE) mediante el procedimiento para microplacas de 96 pozos

A) Preparación de los estándares de albumina de suero bovino (BSA)
Diluir la ampolleta de BSA (2 mg/ml), de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla I. Preparación de los estándares de BSA.

Dilución	PBS (µl)	BSA (µl)	Concentración final de BSA (µg/ml)
A	0	300 del stock	2000
B	125	375 del stock	1500
C	325	325 del stock	1000
D	175	175 de B	750
E	325	325 de C	500
F	325	325 de E	250
G	325	325 de F	125
H	400	100 de G	25
I	400	0	0 (blanco)

B) Preparación de la solución de trabajo (WR)

1. Determinar mediante la siguiente fórmula la cantidad necesaria de solución WR:
2. (# estándares + #desconocidos) (# réplicas, usualmente 3) (0.2 ml de WR por muestra)= volumen total de WR.

3. Preparar la solución WR mezclando 50 partes del reactivo BCA A con 1 parte del reactivo BCA B (50:1, reactivo A:B). Mezclar hasta eliminar la turbidez y que la solución se observe verde claro. La solución estable varios días a temperatura ambiente en un recipiente debidamente sellado.

C) Procedimiento para el ensayo en microplacas (relación muestra a WR= 1:8)

1. Pipetear 25 µl de cada réplica del estándar o muestra en el pozo correspondiente (tomar en cuenta que el rango del ensayo es de 20-2000 µg/ml). Si la muestra problema está por encima del límite superior hay que realizar diluciones.
2. Añadir 200 µl de la solución WR en cada pozo y mezclar agitando la placa durante 30 segundos con un agitador de placas.
3. Cubrir la placa e incubar a 37° C durante 30 min.
4. Enfriar la placa a temperatura ambiente.
5. Leer la absorbancia a 562 nm.
6. Restar la absorbancia promedio del blanco de la absorbancia individual para cada estándar o muestra.
7. Construir una curva estándar graficando las absorbancias promedio corregidas para cada estándar (y) contra la concentración conocida de BSA (x). Efectuar un análisis de regresión lineal. El valor del índice de correlación (R^2)no debe ser menor a 0.97 si no se deberá repetir la curva. Obtener ecuación lineal. (y= b+mx):

Donde:
b= intercepto, m= pendiente, x= concentración (mg/ml), y= valores de absorbancia

Entonces:
Concentración µg/ml={[(abs muestra – abs blanco)-(intercepto)]/pendiente}

Nota: Si se diluyó la muestra hay que multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.

A.9 Cuantificación de proteínas totales en hemolinfa de camarón con el kit Protein Assay (BIO-RAD) mediante el procedimiento para microplacas de 96 pozos

A) Preparación del reactivo

1. Según el volumen de solución de reactivo que se necesite, diluir 1 parte del reactivo concentrado en 4 partes de agua desionizada estéril. Para estimar la cantidad de solución necesario utilizar la siguiente ecuación:

(# estándares o muestras) (# réplicas) X (0.2 ml) = volumen solución de reactivo

2. Filtrar la solución al vacio con un filtro Whatman de 0.2 µm. La solución puede almacenarse hasta 60 días a 4 °C o 2 semanas a temperatura ambiente (15-25 °C).

B) Preparación de los estándares de albumina de suero bovino (BSA)

Preparar una solución stock de BSA a una concentración de 2 mg/ml, y diluir según la siguiente tabla:

Tabla II. Preparación de los estándares de BSA.

Concentración de la curva estándar (mg/ml)	Volumen del stock (µl)	Volumen de agua destilada estéril (µl)	Volumen final (µl)
0.05	12.5	487.5	500
0.1	25	475	500
0.2	50	450	500
0.4	100	400	500
0.5	125	375	500

C) Preparación de las muestras problema

Tomar 5 µl de cada muestra de plasma y diluir en 995 µl de agua destilada estéril (1:200). Para cada réplica de la muestra problema se preparará una dilución.

D) Ensayo

1. Pipetear 10 µl de la muestra o punto de la curva estándar (cargar una réplica o dos por lectura) en un pozo de la microplaca. Considerar también el blanco sin muestra.
2. Añadir 200 µl del reactivo preparado en cada pozo y mezclar con un agitador para microplacas.
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras no deben incubarse más de una hora.
4. Leer la absorbancia a 595 nm.
5. Graficar los datos de absorbancia (y) obtenidos para los puntos de la curva estándar (x). Efectuar análisis de regresión lineal. El valor del índice de correlación (R^2)no debe ser menor a 0.97 si no se deberá repetir la curva. Obtener ecuación lineal. (y= b+mx):

Donde:
b= intercepto, m= pendiente, x= concentración (mg/ml), y= valores de absorbancia

Entonces:
Concentración={[(abs muestra – abs blanco)-(intercepto)]/pendiente}(FD)

Nota: El factor de dilución en este caso es 200, considerar también la dilución con el anticoagulante, por lo cual los valores se deben multiplicar por 3., puesto que a cada muestra de hemolinfa se le agregan 2 volúmenes de anticoagulante.

A.10 Cuantificación de glucosa en hemolinfa de camarón con el kit Liquid Glucose (oxidase) de Pointe Scientific.

A) Ensayo

1. Calentar previamente el termoblock a 37 °C.
2. Pipetear 1 ml de reactivo en los tubos destinados para el blanco de reactivo, el estándar de 100 mg/dL, y las muestras problema (deben medirse por triplicado). Calentar a 37 °C por 10 min.
3. Añadir 10 µl de cada muestra o el estándar en el tubo correspondiente y mezclar por inversión. Regresar inmediatamente el tubo al termoblock una vez puesta la muestra e incubar durante 10 min más.
4. Después de incubar, calibrar el espectofotómetro a 0 con el blanco de reactivo (1 ml de solución de trabajo). Leer las absorbancias de todos los tubos a 500 nm. La reacción es estable durante 1 hr.
5. Promediar las lecturas del blanco y las muestras. Estimar la concentración de las muestras problema, mediante la siguiente fórmula:

Concentración de glucosa (mg/dl)= [(abs muestra)/(abs blanco)] (100)(3)

Nota: Se multiplica por 100, ya que la concentración del estándar es 100 mg/dl y por 3, porque la hemolinfa está diluida 2:1 con el anticoagulante.

A.11 Cuantificación de triglicéridos en hemolinfa de camarón con el kit Triglicérides (GPO) de Pointe Scientific

A) Ensayo

1. Calentar previamente el termoblock a 37 °C.
2. Pipetear 1 ml de reactivo en los tubos destinados para el blanco de reactivo, el estándar de 200 mg/dl, y las muestras problema (deben medirse por triplicado). Calentar a 37 °C por 10 min.
3. Añadir 10 µl de cada muestra o el estándar en el tubo correspondiente y mezclar por inversión. Regresar inmediatamente el tubo al termoblock una vez puesta la muestra e incubar durante 5 min más.
4. Después de incubar, calibrar el espectofotómetro a 0 con el blanco de reactivo (1 ml de solución de trabajo). Leer las absorbancias de todos los tubos a 500 nm. La reacción es estable durante 1 hr.
5. Promediar las lecturas del blanco y las muestras. Estimar la concentración de las muestras problema, mediante la siguiente fórmula:

Concentración de triglicéridos (mg/dl)= [(abs muestra)/(abs blanco)] (200)(3)

Nota: Se multiplica por 200, ya que la concentración del estándar es 200 mg/dl y por 3, porque la hemolinfa está diluida 2:1 con el anticoagulante. El ensayo pierde sensibilidad a concentraciones por debajo de los 10 mg/dl.